

REDOXSTATUS UND WASSERSTOFFTRANSFER
BEI 20-KETOSTEROIDEN

UNTERSUCHUNGEN MIT KRISTALLINER
20 β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE
UND RATTENORGANEN

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DES
FACHBEREICHES PHARMAZIE
DER
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

BENNO RIESSELMANN

AUS
DINKLAGE

BERLIN 1976

REDOXSTATUS UND WASSERSTOFFTRANSFER
BEI 20-KETOSTEROIDEN

UNTERSUCHUNGEN MIT KRISTALLINER
20 β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE
UND RATTENORGANEN

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DES
FACHBEREICHES PHARMAZIE
DER
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

BENNO RIESSELMANN

AUS

DINKLAGE

BERLIN 1976



1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Maurer
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der Promotion: 13. Juli 1976

Meinen Eltern

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegende Arbeit wurde in der Biologisch-Chemischen und Radioisotopen-Abteilung des Institutes für Pharmazie der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel durchgeführt.

Für die wertvollen Anregungen, die zahlreichen klärenden Diskussionen sowie die stete Hilfsbereitschaft möchte ich

Herrn Prof. Dr. M. Wenzel

an dieser Stelle herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Literaturübersicht	4
C. Ergebnisse	11
1. Wasserstofftransfer zwischen Steroiden - Modellver- suche mit der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	11
1.1. Tritiumtransfer auf Steroide mit Ketogruppen am C-20, C-17 und C-3	11
1.2. Wasserstoffübertragung auf Cortison	22
1.3. Einfluß von NADH-Generatoren auf das Redoxver- hältnis Progesterol / Progesteron bei Anwesenheit der kristallinen 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	28
2. Besteht eine Unspezifität der Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden in Bezug auf die Positionen der reduzierbaren Ketogruppen?	32
2.1. T-Transfer von [20 α -T]Progesterol auf 5 β -Pregnan- 20-on	33
2.2. T-Transfer zwischen E ₂ -[17 α -T] und 5 β -Pregnan-20-on	38
3. Lassen sich biochemische Auswirkungen des Wasser- stofftransfers zwischen Steroiden nachweisen?	43
3.1. Wird der Redoxquotient Östradiol / Östron durch 20-Hydroxysterioide beeinflusst?	43
3.2. Wie beeinflussen Wasserstoffdonatoren den Redox- quotienten Progesterol / Progesteron in männlicher und weiblicher Rattenleber?	51

3.3. Einfluß von Nicht-Steroiden	60
3.4. Ändert sich die Redoxlage an C-20 in der geschädigten Leber?	61
3.5. Der Progesterol / Progesteron-Quotient im Rattenovar	64
D. Diskussion der Ergebnisse	68
E. Zusammenfassung	90
F. Präparativer Teil	93
1. Synthese von 5 α - und 5 β -Pregnan-20-on	93
2. Synthese von 5 α - und 5 β -Pregnan-20 β -ol	95
3. Synthese von 5 α -[4- 14 C]Pregnan-3,20-dion	97
G. Material und Methodik	101
H. Literaturverzeichnis	109

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Hormone sind biologische Wirkstoffe, die die Funktion und den Stoffwechsel verschiedener Gewebe und Organe im Körper in charakteristischer Weise koordinieren und kontrollieren. Sie werden in innersekretorischen Drüsen gebildet und gelangen über die Blutbahn zu den spezifischen Wirkorten, wo sie - in geringen Konzentrationen - den Zellstoffwechsel beeinflussen. Nach Erfüllung ihrer physiologischen Aufgaben werden die Hormone durch enzymatische Reaktionen abgebaut und über die Niere ausgeschieden.

Auf Grund der chemischen Struktur unterscheidet man zwei Gruppen: Die Steroid- sowie die Peptid- oder Proteohormone. Die Nebennierenrindenhormone, die den Mineralstoffwechsel oder den Glucosehaushalt beeinflussen, und die geschlechtsspezifischen Hormone sind Steroide, alle anderen Hormone Eiweißabkömmlinge.

Testosteron ist das wichtigste männliche Sexualhormon, Östradiol und Progesteron sind die biologisch aktivsten weiblichen Hormone.

Um Kenntnisse über die Wirkungen dieser Hormone zu erzielen, haben sich in der Steroidforschung drei große Arbeitsgebiete ergeben.

1. Welche biochemischen Vorgänge werden im Organismus durch Steroide gesteuert und beeinflusst?
2. Wie werden die Steroide in den Erfolgsorganen gebunden (Rezeptorstudien), und welche primäre Wirkung kommt ihnen zu?
3. Welche enzymatischen Reaktionen bewirken die Metabolisierung der Steroidhormone?

Für die Problemkreise 1 und 3 kann der direkte und spezifische Wasserstofftransfer zwischen Steroiden von besonderer Bedeutung sein. Als Folge dieser Reaktion vermögen Hydroxysteroiden den Redoxstatus von nicht-korrespondierenden Ketosteroiden direkt zu beeinflussen. Auf diese Weise wird deren biologische Wirkung verändert, ohne daß das NADH / NAD-Redoxpotential der Zelle direkt beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollen Teilaspekte aus diesem Gebiet geklärt und dabei folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist der Wasserstofftransfer zwischen Steroiden eine Funktion der Steroid-Dehydrogenasen, oder ist ein bislang unbekanntes Enzym ("Wasserstofftransferase"?) an der Wasserstoffübertragung beteiligt?

2. Kann eine einzige Hydroxysteroid-Dehydrogenase allein einen Wasserstofftransfer katalysieren, oder müssen zwei Steroid-Dehydrogenasen - ein Enzym oxidiert den Steroidalkohol und das zweite reduziert ein nicht-korrespondierendes Keto-steroid - zusammenarbeiten?

Diese Untersuchungen sollen mit ^3H - und ^{14}C -markierten Steroiden durchgeführt werden, da an Hand ihrer radioaktiven Strahlungen sehr geringe Substanzmengen nachzuweisen sind. Somit besteht die Möglichkeit, im Bereich physiologischer Konzentrationen zu arbeiten.

B. LITERATURÜBERSICHT

Die sehr differenzierte biologische Wirkung der endogenen weiblichen und männlichen Sexualhormone erklärt sich unter anderem aus ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur (siehe *Abbildung 1*). Zwar besitzen sie ein gemeinsames Steroidgerüst, weisen aber an diesem Grundkörper verschiedene reaktive Gruppen auf. Diese sind

1. Hydroxylgruppen
2. Ketogruppen und
3. Doppelbindungen.

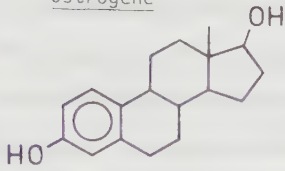
Mit einer Änderung dieser Gruppen unter Beibehaltung des Grundkörpers ändert sich vielfach quantitativ die biologische Wirkung. In den Stoffwechsel- und Erfolgsorganen führen enzymatische Reaktionen zur Bildung von Oxidations- und Reduktionsprodukten. Dadurch kommt es zur Aktivierung oder Inaktivierung der Hormone.

Δ 4-Reduktasen

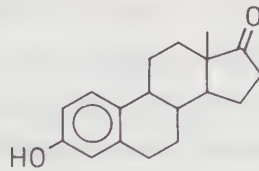
Bei den Sexualhormonen ist als Doppelbindung lediglich eine zwischen den C-Atomen 4 und 5 anzutreffen, die von den Δ 4-Reduktasen reduziert werden kann. Das Vorkommen dieser Enzyme beschreiben als erste TOMKINS und MCGUIRE (1 - 4). Sie beweisen durch photometrische Messungen eine Reduktion der 3-Oxo-

ABB. 1: ENDOGENE STEROIDHORMONE

Östrogene

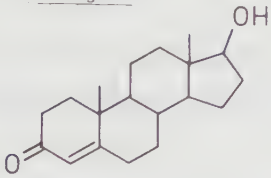


Östradiol

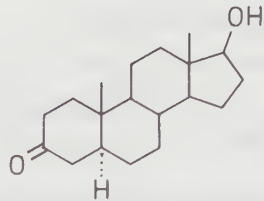


Östron

Androgene

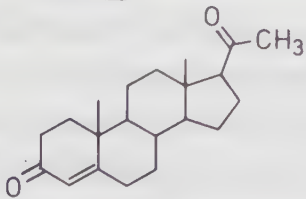


Testosteron



5α-Dihydrotestosteron

Gestagene



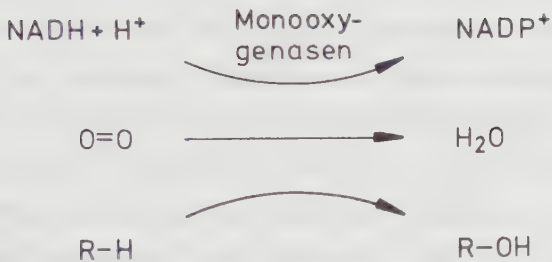
Progesteron

4-en-Gruppierung verschiedener Steroide in Rattenlebermikrosomen. Mittlerweile ist das Vorkommen der $\Delta 4$ -Reduktasen in weiteren Organen, auch in den Erfolgsorganen, bewiesen (5 - 9).

Eine Eigenart der 5α -Steroidreduktase ist bemerkenswert: die Irreversibilität ihrer Reaktion. Das Enzym scheint nur eine Hydrierung, jedoch nicht eine Dehydrierung zu katalysieren. Erst in jüngster Zeit konnte in tierischem Gewebe in geringem Maße die Wiedereinführung der 4,5-Doppelbindung in das Steroidmolekül beobachtet werden (10, 11). Dies ist jedoch schon längere Zeit von Enzympräparationen aus *Pseudomonas testosteronei* (12 - 14) bekannt.

Hydroxylasen

Ein wichtiger Inaktivierungsschritt der Steroidhormone ist ihre Hydroxylierung. Dadurch werden sie hydrophiler, können zu Steroid-Sulfaten und -Glucuroniden verestert und über die Niere ausgeschieden werden. Hauptort derartiger Abbaureaktionen ist die Leber. Wahrscheinlich besorgen unspezifische mikrosomale Hydroxylasen, die auch Arzneimittel hydroxylieren, diese Reaktion (15). Diese Enzyme sind sogenannte Monooxygenasen. Sie bestehen aus Multienzymkomplexen, die neben dem eigentlichen Protein noch ein Hämprotein, Cytochrom P 450, ein Flavoprotein und ein Nicht-Häm-Eisen-Protein (NHI) enthalten. An der enzymatischen Hydroxylierung sind vier Partner beteiligt: Substrat, Enzym, NADPH als Reduktionsäquivalent und molekularer Sauerstoff.



Von dem molekularen Sauerstoff wird ein Atom in das Substrat eingeführt, das zweite wird zu Wasser reduziert.

Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Reduktionen der Oxosteroide bzw. Oxidationen der Steroidalkohole führen die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus. Diese Reaktionen sind reversibel. Hierbei wird entweder Wasserstoff in das Molekül eingeführt oder von ihm übernommen. Coenzyme dieser Reaktionen sind reduzierte oder oxidierte Pyridinnukleotide, also NAD(P)H bzw. NAD(P) (16). Da die Steroidhormone an C-3, C-17 oder C-20 eine Sauerstofffunktion aufweisen, sind demnach die Enzyme der Oxydoreduktionen an Steroiden: 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, 17-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Die Aktivität dieser

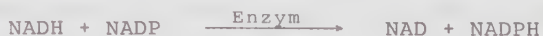
Enzyme ist spezies-, geschlechts-, organ- und altersabhängig (17 - 23).

Hydroxysteroid-Dehydrogenasen kommen in vielen Organen vor (24). Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen besitzen besondere Eigenschaften. Einige dieser Enzyme zeigen eine Unspezifität gegenüber Steroidsubstraten. In den Stoffwechselorganen Leber und Niere werden 17 β -Hydroxylgruppen von Östrogenen und Androgenen mit etwa der gleichen Geschwindigkeit umgesetzt (25 - 28). Weiterhin ist bemerkenswert, daß die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der menschlichen Placenta mit NAD(H) *und* NADP(H) reagiert (29).

Aus diesen etwas ungewöhnlichen Eigenschaften ergeben sich folgende prinzipiell katalysierbare Reaktionen:

1. Oxidation von 17-Hydroxy- und Reduktion von 17-Keto-Steroiden

2. Transhydrogenase-Funktion (30) gemäß der Gleichung

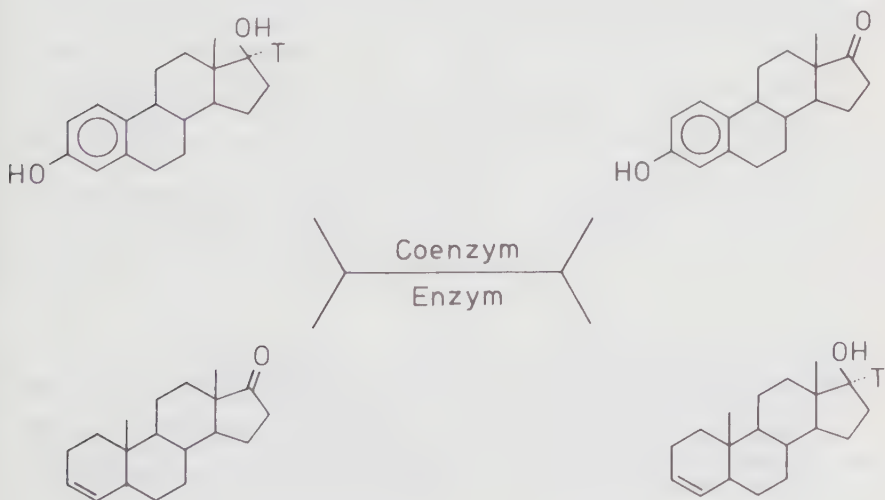


3. Wasserstoff-Transfer zwischen der 17 β -Hydroxy- bzw. 17-Ketogruppe von Östrogenen und Androgenen.

Auf Grund dieser Transhydrogenase-Funktion dient z.B. Östradiol in katalytischen Mengen als Initiator der Wasserstoff-Übertragung zwischen NADPH und NAD (31). Deshalb kann das Re-

doxpaar Östradiol / Östron als intrazellulärer Transportmetabolit für den Wasserstoff dienen (30, 32). Dennoch kann die Transhydrogenase-Funktion nicht mit derjenigen der Dehydrogenase gleichgesetzt werden (30).

Im Rahmen dieser Arbeit interessiert besonders der enzymatische Wasserstofftransfer gemäß Punkt 3. Er ist ausführlich untersucht von oxidierbaren Steroidalkoholen auf Oxosteroide in Organen weiblicher und männlicher Ratten (34 - 40). Bei der Oxidation eines Hydroxysteroides werden Hydridionen abgespalten und auf Ketosteroide übertragen. Dies ist am Beispiel des Tritiumtransfer von E_2 -[17 α -T] auf Androst-3-en-17-on im folgenden Schema dargestellt.



Ungeklärt ist noch, ob nur Steroid-Dehydrogenasen oder auch weitere Enzyme an der enzymatischen Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden beteiligt sind.

Der von einem Hydroxysteroid stammende Wasserstoff wird bis zu einem Faktor 1 000 bevorzugter zur Reduktion eines anderen Ketosteroides verwendet als Wasserstoff, der von einem enzymatisch dehydrierbaren Nichtsteroid stammt. Dies ist auch dann der Fall, wenn ein Nichtsteroids substrat in wesentlich höheren Konzentrationen als das Steroid angeboten wird. Dies trifft unter anderem für Lactat und Isocitrat in der Leber zu. Eine derartige Wasserstoffübertragung findet nicht nur zwischen biologisch aktiven Steroiden statt, sondern ist auch sehr gut meßbar mit Steroiden, denen keine biologische Wirkung zukommt.

C . ERGEBNISSE

1. WASSERSTOFFTRANSFER ZWISCHEN STEROIDEN - MODELLVERSUCHE MIT DER 20 β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

1.1. Tritiumtransfer auf Steroide mit Ketogruppen am C-20, C-17 und C-3

Die bisherigen Untersuchungen über Wasserstoffübertragungen zwischen Steroiden sind mit tierischem Gewebe oder Gewebefractionen durchgeführt worden. Dies hat den Vorteil, daß die in der Zelle stattfindenden Stoffwechselvorgänge nicht ausgeschaltet werden. Für Stoffwechseluntersuchungen, die zu theoretischen Ableitungen und genauen Erläuterungen über Reaktionsmechanismen führen sollen, sind jedoch kristalline Enzympräparationen oder isolierte Enzyme besser geeignet. Somit sind von vornherein Beeinflussungen durch andere Stoffwechselprozesse ausgeschlossen. Durch eine derartige Versuchsanordnung lassen sich Einzelbefunde wesentlich eindeutiger interpretieren.

Aus diesem Grunde benutzen wir für unsere Untersuchungen über den Tritiumtransfer zwischen Steroiden als Enzymquelle die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans*.

SCHMIDT-THOME und Mitarbeiter entdecken 1958, daß *Streptomyces hydrogenans* 20-Ketosteroide in 20 β -Steroidalkohole umzuwandeln vermag (41). Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym kann aus dem Mycel des *Streptomyces*stammes isoliert und als reine 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase kristallisiert werden (42 - 45). Sie reduziert in Gegenwart von NADH 20-Oxosteroide stereospezifisch zu 20 β -Hydroxysteroiden (45). Eine Umkehr dieser Reaktion ist möglich (46).

Da wir annehmen, daß sich einerseits die Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden an Hydroxysteroid-Dehydrogenasen vollziehen und andererseits die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sowohl oxidative wie auch reduktive Prozesse an C-21-Steroiden katalysiert, sollte sich dieses Enzym sehr gut als "Modell-enzym" für den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden eignen.

Wenn diese Versuche mit dem "Modellenzym" gleiche Ergebnisse zeigen wie Untersuchungen mit biologischem Material, lassen sich allgemeine Aussagen über oxidative und reduktive Reaktionen an Steroiden treffen. Zusätzlich kann dann die Frage

Sind nur die Steroid-Dehydrogenasen oder noch eine weitere Enzymgruppe, die sogenannten Wasserstoff-Transferasen, an der enzymatischen Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden beteiligt?

beantwortet werden.

Die 20-Ketogruppe von C_{21} -Steroiden kann in Organen der Ratte durch den Wasserstoff von oxidierbaren 17-Hydroxysteroiden reduziert werden (34, 35, 78). Da für diese Reaktion die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und keine separaten Transferasen verantwortlich gemacht werden, ergibt sich die Frage:

Kann auch die kristalline 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans* eine enzymatische Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden katalysieren?

Zur Überprüfung dieser Frage setzen wir [20 α -T]Progesterol als Wasserstoffdonator ein. Als Akzeptoren verwenden wir zwei Steroide, die sich in der Verknüpfung der Ringe A und B unterscheiden, nämlich 3 α ,5 β -on und 3 α ,5 α -on (ein Verzeichnis der verwendeten Steroide befindet sich auf Seite 102).

Während HÜBENER und Mitarbeiter keinen Einfluß der Ringverknüpfung A/B gesättigter Steroide auf die Geschwindigkeit der C-20-Reduktion finden (42, 46), beschreiben WHITE und JEFFEREY (47) einen höheren K_m -Wert für cis-verknüpfte als für trans-verknüpfte Steroide.

Bei unseren Versuchen wählen wir für Donator, Akzeptor und Coenzym Konzentrationsverhältnisse von 1 : 10 : 100. Diese

auf den ersten Blick großen Mißverhältnisse sind u.a. begründet durch die niedrigere Affinität von NAD als von NADH zum Enzym. BETZ und WARREN geben für NAD einen K_m -Wert an, der um eine Zehnerpotenz höherliegt als für NADH (48). Um eine möglichst vollständige Oxidation des Donators zu erreichen, müssen wir also versuchen, mit hohen Coenzymkonzentrationen eine quantitative Besetzung der Bindungsstellen des Enzyms zu erreichen.

Laut *Abbildung 2* können wir unter unseren Bedingungen einen T-Transfer von der 20 α -Position eines Hydroxysteroides auf ein Ketosteroid messen, der von dem kristallinen Enzym katalysiert wird.

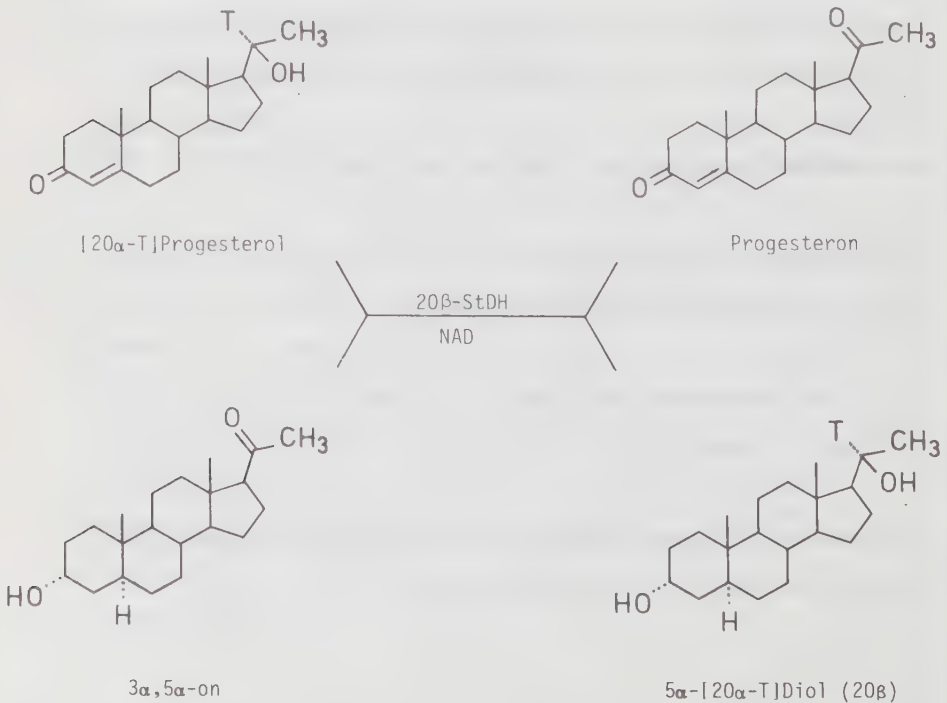
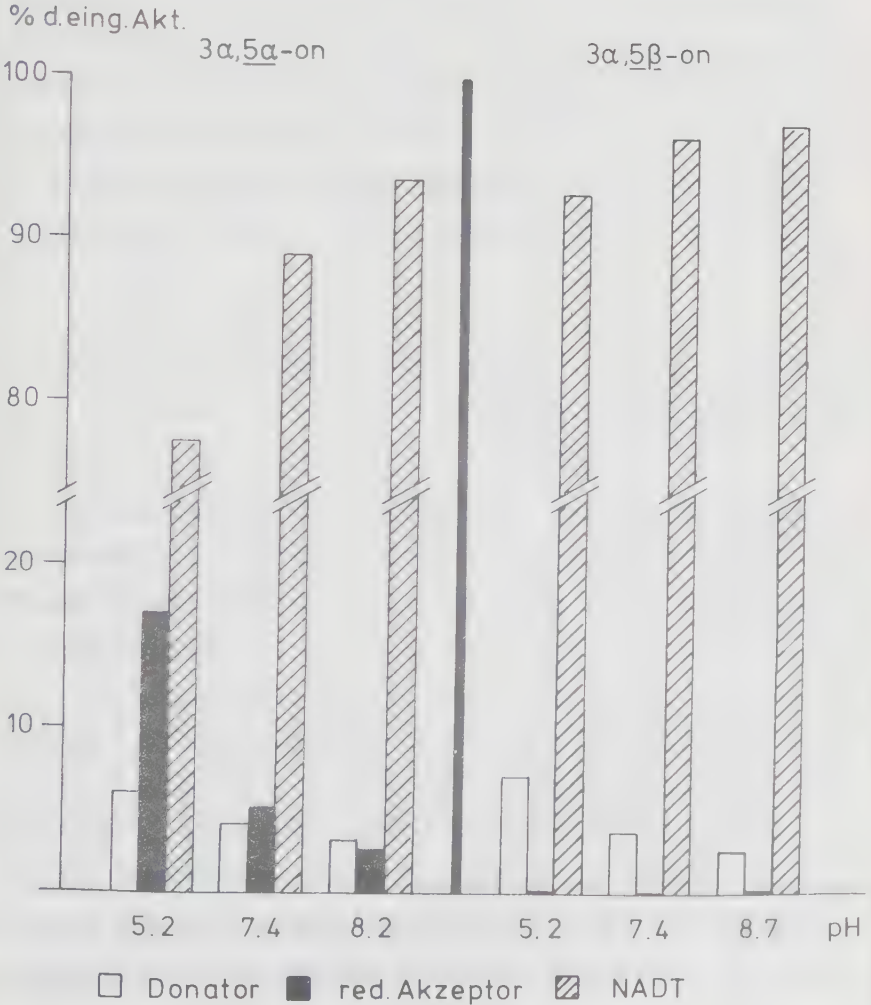


ABB. 2: T-TRANSFER VON [20 α -T]PROGESTEROL AUF 20-KETO-
STEROIDE (F = pH)

In 2 ml 0.1 M Phosphat-Puffer werden 10^{-5} M [20 α -T]Progesteron mit 10^{-4} M 20-Ketosteroid und 10^{-3} M NAD in Gegenwart von 2.5 μ g 20 β -StdH bei 37 °C 60 min inkubiert. Die Werte sind auf 100 % Wiederfindung korrigiert. n = 2



Auffällig ist, daß bei einer cis-Verknüpfung der Ringe A und B kein Tritium aus dem Donator auf den Akzeptor übertragen wird. Dagegen reduziert Tritium die 20-Ketogruppe von trans-verknüpftem Akzeptor. Bemerkenswert ist der hohe Anteil an tritiummarkiertem Coenzym. In der wäßrigen Phase der Inkubationsansätze messen wir kein HTO. Dies kann sich bei unseren Versuchsanordnungen auch nicht bilden, da wir als Enzymquelle lediglich die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase dem Ansatz zugesetzt haben. Es fehlen also die mitochondrialen Enzyme der Atmungskette, die eine Oxidation des Wasserstoffs zu Tritiumwasser bewirken könnten. Daher muß nach Extraktion der Steroide die Restaktivität als reduziertes Coenzym vorliegen. Demnach wird zwar der Wasserstoffdonator oxidiert, das Coenzym überträgt jedoch das Tritium nicht vollständig auf das anwesende Ketosteroid.

Mit diesen Ergebnissen beweisen wir, daß der Wasserstoff oxidierbarer Hydroxysteroiden bei Anwesenheit einer Steroid-Dehydrogenase direkt über ein Coenzym auf Ketosteroiden übertragen werden kann. Somit gibt NADH, das am Enzymprotein gebildet wird, seinen Wasserstoff auf das Akzeptorsteroid weiter. Da diese Vorgänge am gleichen Enzym ablaufen, müssen niedrige NAD-Konzentrationen genügen, um diese Oxidoreduktionen zu erreichen. Das Coenzym vermittelt nämlich nur den Wasserstoff zwischen den beiden Steroiden und wird daher weder verbraucht noch für andere Vorgänge benötigt. Deshalb inkubieren wir die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit variablen

Konzentrationsverhältnissen zwischen Donator, Akzeptor und Coenzym.

Aus *Tabelle 1* ist zu entnehmen, daß der T-Transfer zwischen Steroiden relativ wenig abhängig ist von der Coenzymkonzentration, dagegen mehr vom pH-Wert. Beträgt das Verhältnis zwischen den Steroiden und Coenzym 1 : 1, wird bei pH 8.2 der Akzeptor um den Faktor 2.5 weniger reduziert als wenn NAD im hundertfachen Überschuß zugesetzt ist. Bei pH 5.4 ist es völlig anders. Ein hundertfacher Überschuß des Coenzyms schlägt sich in einer 1.7fach stärkeren Reduktion des Akzeptors nieder.

Eine mögliche Erklärung ist darin zu sehen, daß bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen die Reduktion, bei hohen pH-Werten dagegen die Oxidation des Steroidalkohols begünstigt ist. Ferner ist in diesem Zusammenhang der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Struktur des Enzyms zu bedenken. Von dieser hängt nämlich die Bindung des Substrates an das Enzym ab.

Die oben angegebenen Befunde zeigen eine Tritiumübertragung von der 20 α -Position des Steroides A auf die 20 α -Position des Steroides B. Die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase reagiert also mit verschiedenen Hydroxy- / Oxosteroid-Partnern. Dies bedeutet u.a. eine Unspezifität des Enzyms in Bezug auf die Steroidsubstrate mit Sauerstofffunktionen am C-20. Die Sub-

TAB. 1: T-TRANSFER VON [20 α -T]PROGESTEROL AUF 3 α -HYDROXY-5 α -PREGNAN-20-ON

In 2 ml 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 5.4 bzw. 8.2, werden 2.5 μ g 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit 10^{-5} M [20 α -T]Progesterol und 10^{-5} M 3 α -Hydroxy-5 α -pregnan-20-on sowie 10^{-5} M bzw. 10^{-3} M NAD bei 37 °C 15 min inkubiert. Die Werte sind auf 100 % Wiederfindung korrigiert. n = 4

		NAD 10^{-5} M	NAD 10^{-3} M
		% der eingesetzten Aktivität als	% der eingesetzten Aktivität als
pH 8.2	Donator	7.9 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.3
	red. Akzeptor	3.5 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.2
	NADT	88.5 $\pm$ 1.2	85.4 $\pm$ 2.1
pH 5.4	Donator	20.7 $\pm$ 1.5	13.3 $\pm$ 0.1
	red. Akzeptor	11.2 $\pm$ 0.1	18.9 $\pm$ 1.2
	NADT	68.2 $\pm$ 1.9	67.8 $\pm$ 2.7

stratunspezifität der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen ist nach WENZEL und Mitarbeiter (33) eine Voraussetzung für den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden.

Die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase besitzt zusätzlich noch eine Positionsunspezifität. Sie weist eine gewisse 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität auf. Diese bezieht sich nur auf 5 α -Pregnane oder 5 α -Androstane, jedoch nicht auf Ring A ungesättigte oder Ring A/B cis-verknüpfte 3-Ketosteroiden (49 - 51). Auf Grund der Substrat- und Positionsunspezifität ist eine Tritiumübertragung auf andere reduzierbare Ketosteroiden z.B. von C-20 nach C-3 zu erwarten.

Kann mit der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase als Enzymquelle ein T-Transfer von [20 α -T]Progesteron auf verschiedene 3-, 17- und 20-Ketosteroiden gemessen werden?

Wie aus der *Tabelle 2* zu ersehen ist, findet unter den von uns gewählten Bedingungen nur eine Wasserstoffübertragung auf 20-Ketosteroiden statt. Auffälligerweise ist keine Reduktion der 3-Ketogruppe zu erkennen, obwohl das Enzym eine geringe 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität besitzt. Dagegen ist zu erwarten, daß Östron als 17-Ketosteroid nicht durch Tritium vom Donator reduziert wird.

TAB. 2 : T-TRANSFER VON [20 α -T]-20 β -HYDROXY-4-PREGNEN-3-ON
AUF KETOSTEROIDE

In 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.4, werden 10^{-5} mol/l [20 α -T]Progesterol zusammen mit 10^{-5} mol/l NAD und 10^{-5} mol/l Ketosteroid unter Zusatz von 2.5 μ g 20 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase 5 min bei 37°C inkubiert. Die Wiederfindung der T-Aktivität liegt zwischen 90 und 95%. Die Werte sind auf 100% korrigiert. n = 2

Ketosteroid	Verteilung der Aktivität in		
	Donator (nmol)	reduzierten Akzeptor (nmol)	H ₂ O-Phase ≙ NADT (nmol)
Kontrolle	7.4	-	23.6
5 α -Pregnan-20-on	8.5	1.2	21.3
5 α -Pregnan-3,20-dion	8.0	1.8	21.2
Östron	9.3	< 0.03	21.7
5 α -Androstan-3,17-dion	8.4	< 0.03	22.6
4-Pregnen-3-on	9.2	< 0.03	21.8
4-Androsten-3-on	9.5	< 0.03	21.5
Cortison	7.1	< 0.03	23.1

Betrachtet man die *Tabelle 2* genauer, so erkennt man, daß die Oxidation des Hydroxysteroides durch ein zweites anwesendes Steroid vermindert wird. Dabei ist der Molekülaufbau unbedeutend. Aus diesem Ergebnis stellt sich die Frage:

Kann durch verzögerte Zugabe des Akzeptors eine höhere T-Übertragung von [20 α -T]Progesterol auf 5 α -Pregnan-3,20-dion bzw. 5 α -Androstan-3,17-dion erreicht werden?

Die Vorinkubation ohne Akzeptor muß eine vermehrte Bildung von reduziertem Coenzym bewirken, das dann anschließend in höherem Maße zur Hydrierung des Ketosteroides zur Verfügung steht.

Laut *Abbildung 2* wird tatsächlich durch die verzögerte Zugabe des Akzeptorsteroides 5 α -Pregnan-3,20-dion um das 3fache stärker reduziert, während 5 α -Androstan-3,17-dion nicht hydriert wird. Wir können also auch unter den veränderten Bedingungen keine 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität feststellen. Bemerkenswert ist die entgegen den obigen Ableitungen geringere NADT-Konzentration nach der Vorinkubation. Die geringere NADT-Bildung ist nämlich nicht auf eine gleichzeitig höhere Akzeptorreduktion zurückzuführen. Wir vermuten daher eine Rückbildung des Donators. Vermehrt entstandenes NADT dissoziiert nicht vom Enzymprotein, sondern reduziert vielmehr ein anwesendes Ketosteroid. Das Enzym kann nicht "erkennen", ob

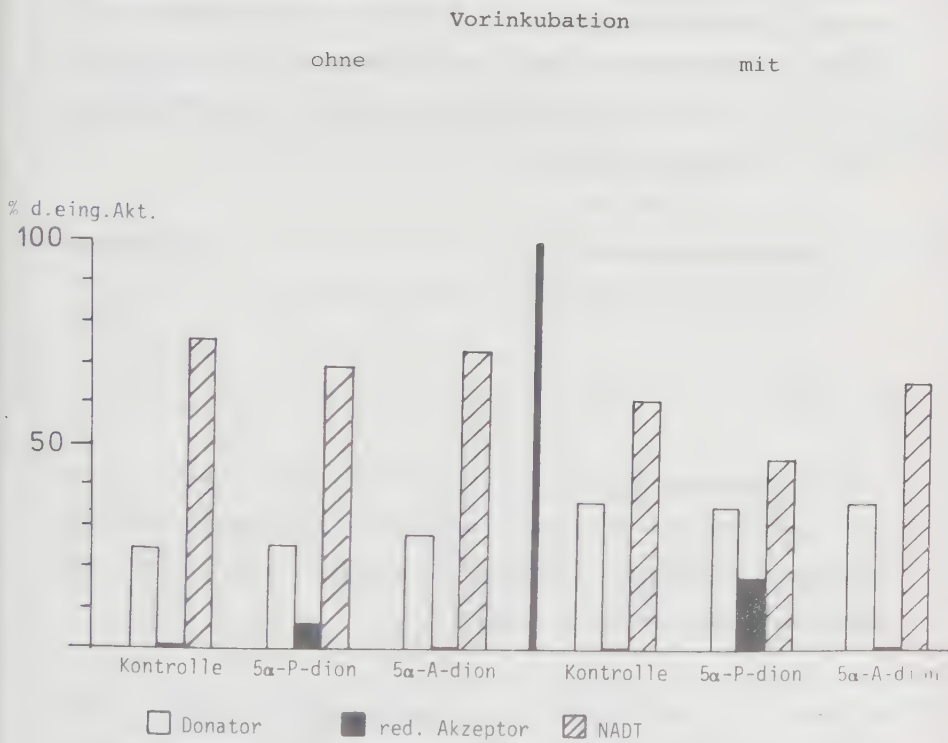
dieses Ketosteroid nun oxidiertes Donator oder Akzeptor ist. Das Resultat der Vorinkubation ist dann eine erhöhte Donatorkonzentration. Diesen Mechanismus leiten wir aus der *Abbildung 3* ab. Nach der Vorinkubation finden wir nämlich sowohl in den Kontrollansätzen, d.h. ohne Zusatz eines zweiten Steroides, als auch in den Ansätzen mit den Akzeptorsteroiden die gleiche Menge nichtoxidierten Donators. Diese ist ca. 10% höher als in den entsprechenden Ansätzen ohne Vorinkubation. Deshalb nehmen wir an, daß zunächst hydriertes Coenzym in einem zweiten Reaktionsschritt ein Oxosteroid reduziert.

1.2. Wasserstoffübertragung auf Cortison

Die bisher angegebenen Ergebnisse über die Tritiumübertragung zwischen Steroiden lassen sich nicht direkt mit den Verhältnisse bei der Übertragung von Wasserstoff vergleichen. Da Tritium langsamer als Wasserstoff reagiert, sind die T-Transferaten im Vergleich zum H-Transfer zu klein. Diesen Isotopieeffekt untersuchen BJORKHEM und Mitarbeiter bei dem T-Transfer von NADPH auf Steroide, die von der 5β -Steroidreduktase katalysiert wird. Sie finden einen Faktor von 4 (52, 53). Zu ähnlichen Werten kommen japanische Autoren bei ihren Untersuchungen mit der 20α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Schweine-*testis*. Der liegt der Faktor des Isotopieeffektes zwischen 4 und 5 (54). Bei der Tritiumübertragung von Nichtsteroidsubstraten ist ein Isotopieeffekt in gleicher Höhe meßbar. FREU-

Abb. 3 : T-TRANSFER VON [20 α -T]-20 β -HYDROXY-4-PREGNEN-3-ON
AUF KETOSTEROIDE NACH VERZÖGERTER AKZEPTORZUGABE

Bedingungen: gemäß Tab. 2 bzw. 5 min Vorinkubation ohne Akzeptorsteroid. n = 2



DENTHAL gibt für den T-Transfer von Isocitrat auf NADP ebenfalls einen Faktor von 4 an (55).

Um diesen Isotopieeffekt bei unseren Untersuchungen auszuschalten, wählen wir als Ketosteroid $[4-^{14}\text{C}]$ Cortison und als Wasserstoffdonator Progesterol. In dieser Versuchsanordnung wird der Isotopieeffekt durch das Fehlen von Tritium im Donator bei der Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden eliminiert. Gleichzeitig wollen wir die Fragestellung

Ist am Enzymprotein in situ erzeugtes NADH ein wirksames Reduktionsmittel als exogenes NADH?

überprüfen.

Diese Problemstellung ist insofern interessant, weil in Rattenlebermikrosomen mit einer Kombination von Testosteron und NAD Östron schneller zu Östradiol reduziert wird als mit der äquimolaren Konzentration NADH (33).

Aus *Tabelle 3* geht hervor, daß exogenes NADH Cortison um den Faktor 5.6 stärker reduziert als Wasserstoff aus der äquimolaren Konzentration NAD + Progesterol. Es ist nur eine geringe Reduktion des Cortisons durch den Wasserstoff eines Hydroxysteroides zu messen. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse wird nun verständlich, warum beim Tritiumtransfer von $[20\alpha\text{-T}]$ -

TAB. 3: CORTISONREDUKTION DURCH VERSCHIEDENE H_2 -DONATOREN

In 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.4 werden $3.6 \cdot 10^{-7}$ M Cortison mit 10^{-6} M Progesterol und 10^{-6} M NAD oder mit 10^{-6} M NADH bei Anwesenheit von 2.5 μ g Enzym bei 37 °C 5 min inkubiert. Etwa 85 % der eingesetzten Aktivität werden wiedergefunden und gleich 100 % gesetzt. n = 2

H_2 -Donator	Wiederfindung der Akt. in % als	
	Cortison	20-OH-Cortison
Kontrolle	99.5	0.5
NAD 10^{-6} M	89.9	10.1
Progesterol 10^{-6} M + NAD 10^{-6} M	98.2	1.8

Progesterol auf Cortison keine Akzeptorreduktion gemessen wird (siehe *Tabelle 2*). Es muß nämlich der Isotopieeffekt berücksichtigt werden, wie ihn einige Autoren beschreiben (52 - 55).

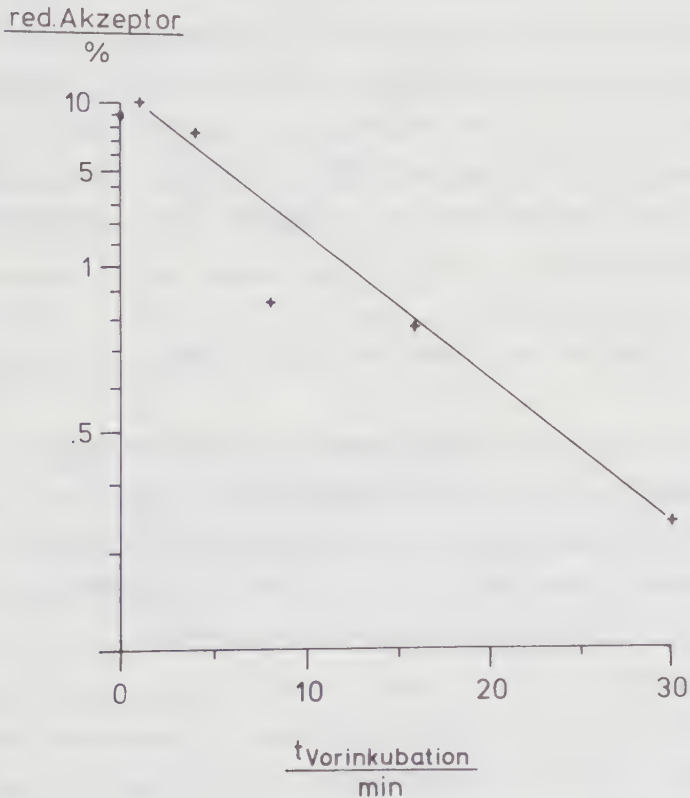
Da wir im Kapitel C 1.1. *Abbildung 3* eine vermehrte Tritium-übertragung zeigen können, wenn das Akzeptorsteroid verzögert dem Ansatz hinzugefügt wird, wollen wir durch eine Änderung der Versuchsbedingungen eine höhere Cortisonreduktion erreichen.

Kann durch verzögerte Zugabe von Cortison dessen Reduktion durch in situ erzeugtes NADH gesteigert werden?

Wir inkubieren Enzym, NAD und Progesterol und geben Cortison nicht gleichzeitig, sondern verzögert dem Inkubationsansatz hinzu. In *Abbildung 4* ist die Ausbeute der Cortisonreduktion in halblogarithmischer Darstellung gegen die Verzögerungszeit aufgetragen und die Halbwertszeit für den Abfall der Ausbeute bestimmt. Diese ist um den Faktor 3.3 größer als die für die mikrosomale 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der weiblichen Rattenleber (33).

ABB. 4: EINFLUSS DER VERZÖGERUNGSZEIT AUF DIE CORTISON-
REDUKTION (HALBLOGARITHMISCH) HWZ = 11.6 MIN

In 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.4, werden bei 37°C 10^{-6} mol/l Progesterol, 10^{-6} mol/l NAD und 2.5 µg 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase 0 - 30 min vorinkubiert. Nach dieser Zeit wird zu den Ansätzen $3.6 \cdot 10^{-7}$ mol/l Cortison gegeben und weitere 5 min bei 37°C inkubiert. n = 2



1.3. Einfluß von NADH-Generatoren auf das Redoxverhältnis
Progesterol / Progesteron bei Anwesenheit der kristal-
linen 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Reduzierte Pyridinnukleotide, die bei der Oxidation von Hydroxysteroiden in der Leber entstehen, vermögen Ketosteroide stärker zu reduzieren als Wasserstoff anderer oxidierbarer Substrate oder als exogenes NADH. So wird in Rattenlebermikrosomen Östron durch zugesetztes NADH langsamer reduziert als durch die äquimolare Konzentration der Kombination Testosteron und NAD (33). Dieser bevorzugte Wasserstofftransfer zwischen Steroiden kann z.B. in der Rattenleber zu einer starken Erhöhung des Östradiol / Östron-Verhältnis führen. Dies deutet eine relative Unabhängigkeit vom zellulären NADH / NAD-Redoxverhältnis an (56).

Für uns ergibt sich aus diesem Befund die Frage:

Ist die relative Unabhängigkeit des Redoxquotienten Östradiol / Östron vom Redoxsystem NAD / NADH eine spezielle Eigenschaft der östrogenen Hormone in der Leberzelle oder läßt sich eine derartige Unabhängigkeit auch für andere Steroide feststellen?

Diese Frage überprüfen wir am Verhältnis Progesterol / Progesteron in Gegenwart der kristallinen 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase als Enzymquelle nach Zugabe verschiedener NADH-Generatoren-Systeme.

Entsprechend der *Tabelle 4* wird Progesteron bei Abwesenheit der Coenzyme, jedoch in Gegenwart aller anderen Reaktionspartner (= Kontrolle) so gut wie gar nicht reduziert, was unter unseren Versuchsbedingungen auch zu erwarten ist. Deutlich sind der unterschiedliche Einfluß der verschiedenen Reduktionsmittelsysteme und die Auswirkungen der Wasserstoffionenkonzentration des Ansatzmediums auf das Progesterol / Progesteron-Verhältnis zu erkennen. Auffällig ist die herausragende Bedeutung von exogenem NADH. Unter allen geprüften Bedingungen bewirkt zugesetztes NADH immer einen höheren Progesterol / Progesteron-Quotienten als die Kombination 5α -Pregnan- $3\alpha,20\beta$ -diol mit NAD.

Dieses Ergebnis zeigt, daß für die 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans* nicht zutrifft, was für die mikrosomale 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Rattenleber gilt. Vielmehr ist für das kristalline Enzym exogenes NADH ein wesentlich potenteres Reduktionsmittel als in situ erzeugte Reduktionsäquivalente. Deshalb stellt sich auch ein höherer Progesterol / Progesteron-Quotient durch die Zugabe von NADH ein. Auffällig an unseren Werten ist die Tatsache,

TAB. 4: EINFLUSS VON NADH-GENERATOREN AUF DEN QUOTIENTEN PROGESTEROL/PROGESTERON AN DER KRIST. 20β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

In 2.0 ml 0.1 M Phosphat-Puffer pH 6.5; 7.4 bzw. 8.3 werden 10 μ g 20β -STDH mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Progesteron und 10^{-5} M 5-Pregnan-3,20-diol unter Zusatz von 10^{-5} M NADH bzw. 10^{-4} M, 10^{-5} M oder $5 \cdot 10^{-7}$ M NAD inkubiert. $n = 4$

Reduktion durch	pH 6.5		pH 7.4		pH 8.3	
	Progesterol/ Progesteron	Fak.	Progesterol/ Progesteron	Fak.	Progesterol/ Progesteron	Fak.
Kontrolle	0.018 ± 0.001	1	0.018 ± 0.001	1	0.018 ± 0.001	1
NADH 10^{-5} M	29.45 ± 1.65	1636	8.91 ± 0.59	495	1.59 ± 0.04	88.3
5α -Diol(20β) 10^{-5} M + NAD 10^{-4} M	0.11 ± 0.006	6.1	0.09 ± 0.007	5.0	0.02 ± 0.000	1.1
5α -Diol(20β) 10^{-5} M + NAD 10^{-5} M	0.70 ± 0.10	38.9	0.31 ± 0.09	17.2	0.03 ± 0.01	1.7
5α -Diol(20β) 10^{-5} M + NAD 5.10^{-7} M	1.78 ± 0.03	98.9	1.54 ± 0.01	85.6	1.11 ± 0.04	61.6

daß eine niedrige Konzentration an oxidiertem Coenzym in der Kombination 5 α -Pregnan-3 α ,20 β -diol mit NAD ein höheres Verhältnis Progesterol / Progesteron bewirkt als eine 20fach höhere NAD-Konzentration. Dies stimmt allerdings mit früheren Ergebnissen unseres Arbeitskreises überein, wonach katalytische Coenzymkonzentrationen eine höhere Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden bewirken. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, daß hohe NAD-Konzentrationen den Steroidwasserstoff für die Reduktion zu NADH verbrauchen, während bei geringen NAD-Konzentrationen der Wasserstoff zum Progesteron weitergeleitet wird.

2. BESTEHT EINE UNSPEZIFITÄT DER WASSERSTOFFÜBERTRAGUNG
ZWISCHEN STEROIDEN IN BEZUG AUF DIE POSITIONEN DER
REDUZIERBAREN KETOGRUPPEN ?

In mehreren Arbeiten beschreiben WENZEL und Mitarbeiter einen enzymatischen Wasserstofftransfer zwischen Hydroxysteroiden und Akzeptorsteroiden (33 - 40). Dieser ist nicht nur bei einem Übergang des Wasserstoffs auf dieselbe Position (z.B. C-17 $\rightarrow$ C-17), sondern auch auf andere reduzierbare Ketogruppen der Akzeptorsteroiden (z.B. C-17 $\rightarrow$ C-3; C-17 $\rightarrow$ C-20) meßbar. Bemerkenswert ist jedoch, daß eine nicht-positions-spezifische Übertragung wesentlich niedriger ist als eine positionsspezifische (57).

Da diesem Wasserstofftransfer möglicherweise eine Bedeutung im Stoffwechsel der Steroidhormone zukommt, interessiert, ob eine Wasserstoffübertragung sowohl zwischen biologisch aktiven als auch inaktiven Steroiden stattfindet.

Für den positionsspezifischen Wasserstoffübergang an C-17 ist bereits bewiesen, daß Androst-3-en-17-on als biologisch unwirksames Steroid hohe Akzeptoreffektivität (58, 59) und Androst-3-en-17 β -ol als biologisch inaktives Steroid Donatoreigenschaften besitzt (60).

Der nicht-positionsspezifische Wasserstofftransfer (C-17 $\rightarrow$ C-20) ist bislang lediglich zwischen Östradiol als Donatorsteroid und den biologisch stark wirksamen 20-Ketosteroiden Progesteron (34) bzw. Cortison (35) untersucht worden.

Wir wollen in dieser Arbeit den Beweis führen, daß auch ein biologisch inaktives 20-Oxopregnanderivat als Akzeptorsteroid fungieren kann, wenn [20 α -T]Progesterol oder [17 α -T]Östradiol als Wasserstoffdonatoren eingesetzt werden.

2.1. T-Transfer von [20 α -T]Progesterol auf 5 β -Pregnan-20-on

Im Kapitel C 1. zeigen wir, daß mit der kristallinen 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase als Enzymquelle eine Wasserstoffübertragung zwischen [20 α -T]Progesterol und 20-Ketopregnanen möglich ist. Ein Wasserstofftransfer ist also nicht unbedingt an Gewebe oder Gewebefractionen gebunden, mit denen die bisherigen Untersuchungen zum T-Transfer zwischen Steroiden durchgeführt worden sind.

Ist das biologisch unwirksame Steroid 5 β -Pregnan-20-on auch in der weiblichen Rattenleber ein Akzeptor für den Wasserstoff von [20 α -T]Progesterol?

Zur Überprüfung dieser Frage inkubieren wir Schnitte weibli-

cher Rattenleber mit $[20\alpha\text{-T}]\text{Progesterol}$ und $5\beta\text{-Pregnan-20-on}$. In *Abbildung 5* ist der T-Transfer in Abhängigkeit von der $5\beta\text{-Pregnan-20-on}$ -Konzentration dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, daß der Akzeptor bei großem Überschuß stärker vom Donatorwasserstoff reduziert wird als bei niedrigen Konzentrationen.

Dies drückt sich sowohl im prozentualen Anteil der Wiederfindung der eingesetzten Aktivität im reduzierten Akzeptor als auch in der absoluten Konzentration an reduziertem Akzeptor aus. Mit abnehmender Akzeptorkonzentration wird immer weniger Tritium in ihn eingebaut.

Ähnliches ist zu erkennen, wenn der Wasserstoffübergang in Abhängigkeit von der Donatorkonzentration gemessen wird. *Abbildung 6* gibt den T-Transfer als Funktion der Donatorkonzentration wieder. Bei einem 16fachen Überschuß an $[20\alpha\text{-T}]\text{Progesterol}$ wird weniger Tritiumaktivität im reduzierten Akzeptor wiedergefunden als bei einem Verhältnis von 1 : 1 zwischen Donator und Akzeptor. Allerdings steigt nun die absolute Menge an reduziertem Akzeptor.

Welche Beziehungen zwischen dem T-Transfer von $[20\alpha\text{-T}]\text{Progesterol}$ auf $5\beta\text{-Pregnan-20-on}$ und der Akzeptorreduktion in Abhängigkeit von dem Donator / Akzeptor-Verhältnis besteht, ist in der *Tabelle 5* angegeben. In ihr sind die Ergebnisse aus den

ABB. 5: T-TRANSFER VON $[20\alpha\text{-T}]\text{PROGESTEROL}$ AUF $5\beta\text{-PREGNAN-20-ON}$ IN RATTENLEBER (♀). (F = AKZEPTORKONZENTR.)

100 mg Leberschnitte von Rattenweibchen werden mit $[20\alpha\text{-T}]\text{-Progesterol}$ ($1 \cdot 10^{-7}$ M) unter Zusatz von $1 - 200 \cdot 10^{-7}$ M $5\beta\text{-Pregnan-20-on}$ in 4.1 ml TRIS-HCl-Puffer, pH 7.4, 15 min bei 37°C inkubiert. $n = 4$

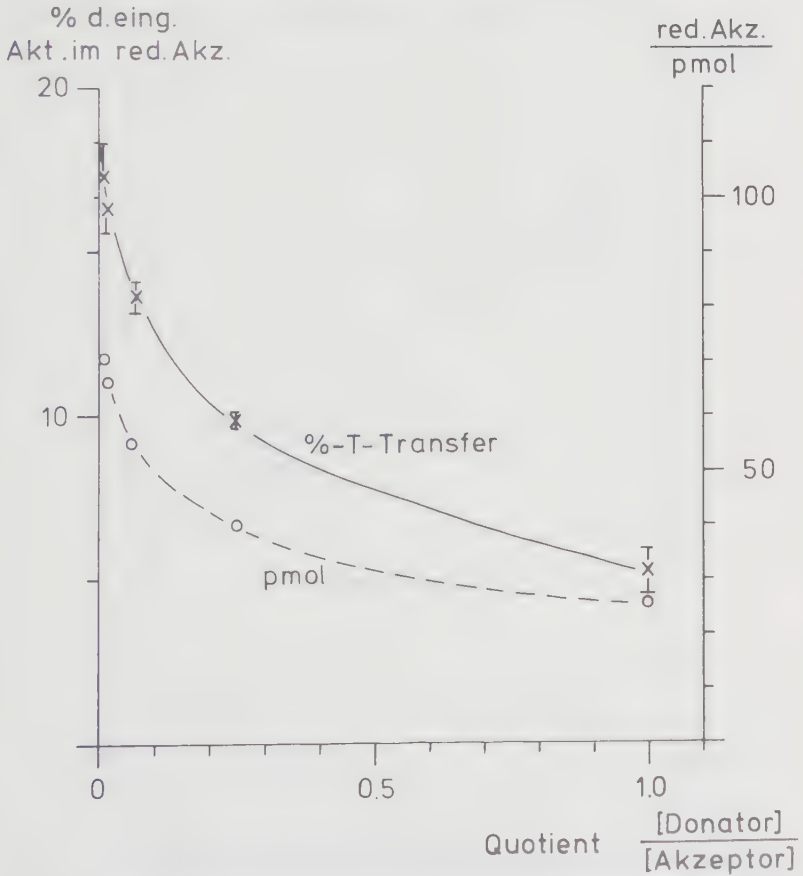
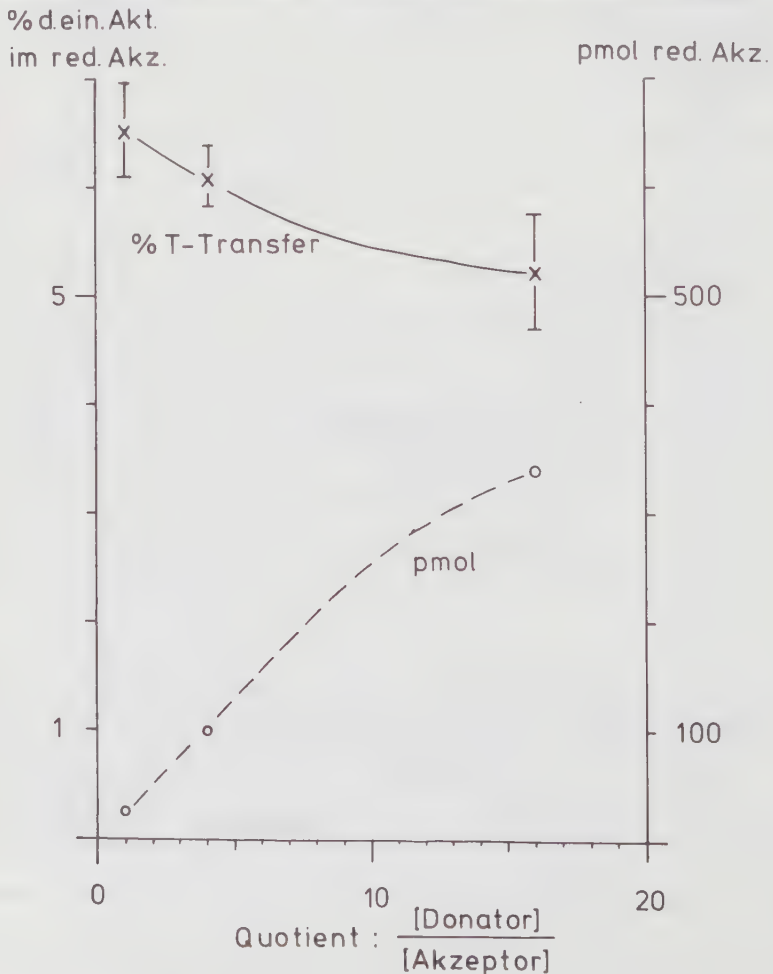


ABB. 6: T-TRANSFER VON $[20\alpha\text{-T}]$ PROGESTEROL AUF 5β -PREGNAN-20-ON IN RATTENLEBER (♀), (F = DONATORKONZENTR.)

100 mg Leberschnitte von Rattenweibchen werden mit 5β -Pregnan-20-on ($1 \cdot 10^{-7}$ M) unter Zusatz von $1 - 16 \cdot 10^{-7}$ M Progesteron (= 2.85 μCi) in 4.1 ml TRIS-HCl-Puffer, pH 7.4, 15 min bei 37°C inkubiert. n = 4



TAB. 5: AKZEPTORREDUKTION ALS FUNKTION DES
DONATOR / AKZEPTOR - VERHÄLTNISSSES

Bedingungen: siehe *Abbildung 5 und 6*

Q	T-Transfer	red. Akzeptor
	[%]	[%]
16	5.2 ± 0.5	82.9
4	6.1 ± 0.3	24.4
1	6.5 ± 0.8	6.5
0.25	9.8 ± 0.08	2.44
0.0625	13.5 ± 0.7	0.84
0.0155	16.3 ± 0.8	0.26
0.005	17.3 ± 0.9	0.09

$$Q = \frac{[\text{Donator}]}{[\text{Akzeptor}]}$$

Abbildungen 5 und 6 zusammengefaßt, da diese unterschiedliche Quotientenbereiche - in der Abbildung 5 ist der Quotient kleiner als 1, in der Abbildung 6 größer als 1 - umfassen. Deutlich ist zu erkennen, daß zwar mit Zunahme der Akzeptorkonzentration immer mehr Tritium aus dem Donator in 5 β -Pregnan-20-on eingebaut wird, aber die relative Akzeptorreduktion abnimmt. So werden bei einem 16fachen Überschuß an [20 α -T]-Progesteron nur 5.2 % Tritium auf 5 β -Pregnan-20-on übertragen. Dies bedeutet jedoch eine etwa 83proz. Reduktion des Akzeptors durch Donatorwasserstoff. Umgekehrt werden zwar bei einem 200fachen Überschuß an 5 β -Pregnan-20-on 17.3 % Progesteron-Tritium auf den Akzeptor übertragen, was aber nur einer Reduktion von weniger als 0.1 % Akzeptor entspricht.

Gemäß der Tabelle 5 wird bei einem Überschuß des Akzeptors in höherem Anteil [20 α -T]Progesteron durch das Ketosteroid oxidiert als bei einem Überschuß des Donators.

2.2 T-Transfer zwischen E₂-[17 α -T] und 5 β -Pregnan-20-on

WENZEL und Mitarbeiter beobachten einen enzymatischen T-Transfer in Rattenorganen von E₂-[17 α -T] auf Progesteron bzw. Cortison (C-17 $\rightarrow$ C-20) (34, 35). Damit ist bewiesen, daß Östradiol biologisch wirksame, endogene 20-Ketosteroide reduzieren kann. 5 β -Pregnan-20-on kann durch [20 α -T]Progesteron re-

duziert werden (siehe Kapitel C 2.1.). Dies bedeutet eine positionsspezifische Wasserstoffübertragung auf ein biologisch unwirksames Steroid nach dem Schema C-20 $\rightarrow$ C-20.

Wir wollen nun untersuchen, ob auch Östradiol ein biologisch inaktives 20-Ketosteroid reduzieren kann.

Deshalb inkubieren wir Leberhomogenat weiblicher Ratten mit 5 β -Pregnan-20-on und steigenden Östradiolkonzentrationen. In *Abbildung 7* ist die prozentuale Wiederfindung der eingesetzten Aktivität im reduzierten Akzeptor und im Tritiumwasser angegeben. Es ist zwar ein T-Transfer auf 5 β -Pregnan-20-on zu messen, jedoch ist dieser sehr gering. Die gefundenen Werte liegen unter 0.1 %, bezogen auf die eingesetzte Aktivität. Mit steigenden Östradiolkonzentrationen nimmt die relative Akzeptorreduktion durch Tritium ab. Gleichzeitig verringert sich der relative Tritiumeinbau in Wasser. Dies bedeutet, daß bei niedrigen Donatorkonzentrationen mehr Östradiol oxidiert wird, dessen Wasserstoff dann überwiegend zu Wasser oxidiert und nicht auf ein angebotenes Akzeptorsteroid übertragen wird.

Bei diesem C-17 $\rightarrow$ C-20-Transfer steigt jedoch ähnlich wie bei dem C-20 $\rightarrow$ C-20-Transfer (siehe *Abbildung 6*) die absolute Menge an reduziertem Akzeptor bzw. an gebildetem HTO an (siehe *Abbildung 7a*).

ABB. 7 : T-EINBAU AUS E_2 [17 α -T] IN 5 β -PREGNAN-20-ON UND
 H_2O IM HOMOGENAT RATTENLEBER (♀), F(E_2 -KONZENTR.)

Homogenat $\hat{=}$ 200 mg Rattenleber (♀) wird mit 5 β -Pregnan-20-on
 (10^{-7} mol/l) unter Zusatz steigender E_2 -Konzentration in 4.1
 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7.4, 10 min bei 37°C inkubiert. n = 2

% d.eing. Akt.

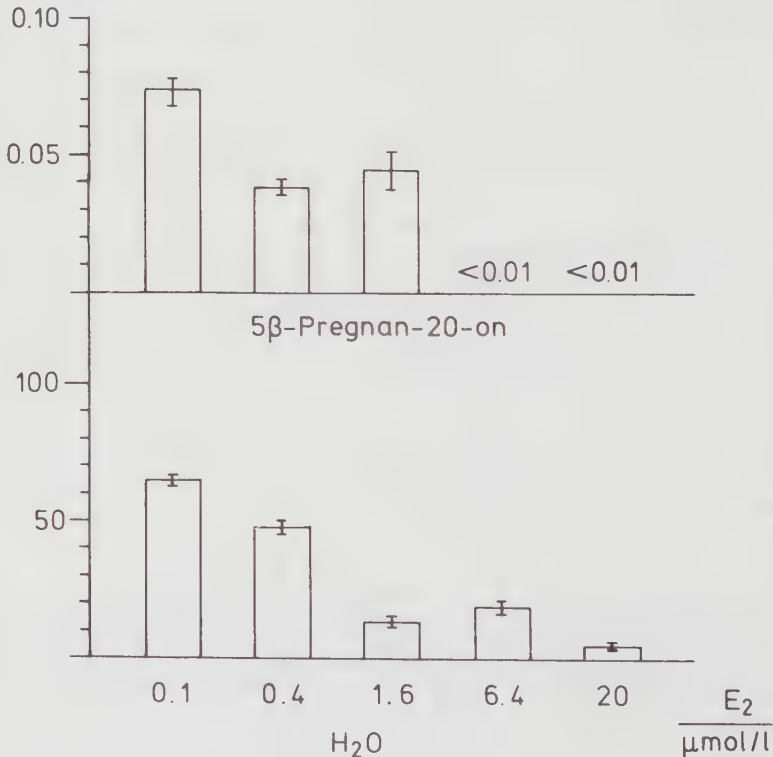
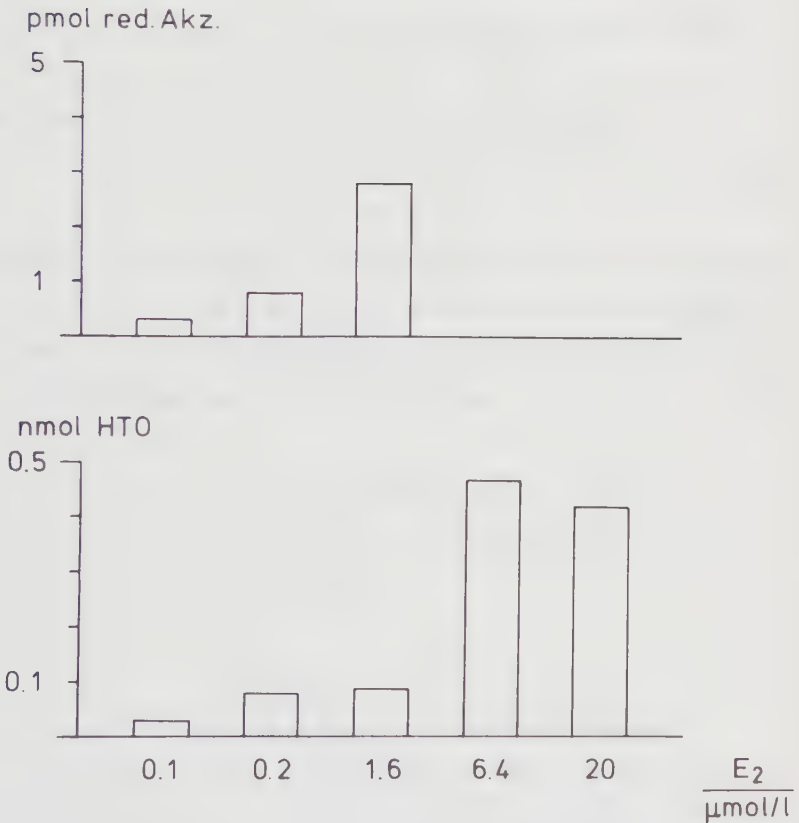


ABB. 7A: T-EINBAU AUS E_2 [17 α -T] IN 5 β -PREGNAN-20-ON UND H_2O IM HOMOGENAT RATTENLEBER (♀), F(E_2 -KONZENTR.)

Bedingungen: siehe Abbildung 7



Vergleicht man unsere Befunde über die Wasserstoffübertragungen auf 5 β -Pregnan-20-on miteinander, so bestätigen sich frühere Ergebnisse unseres Arbeitskreises.

Grundsätzlich ist eine höhere Wasserstoffübertragung dann zu erkennen, wenn Hydroxy- und Ketogruppe in ihren Positionen am Steroidgerüst übereinstimmen.

Ein nicht-positionsspezifischer Wasserstofftransfer ist zwar meßbar, jedoch geringer als ein positionsspezifischer.

Das Ausmaß der Wasserstoffübertragung fällt mit steigender Donatorkonzentration und korreliert mit der Oxidation des Donatorwasserstoffs zu Wasser. Diese Ergebnisse sind auf geringe Donatoroxidation bei höheren Konzentrationen zurückzuführen.

3. LASSEN SICH BIOCHEMISCHE AUSWIRKUNGEN DES WASSERSTOFF- TRANSFERS ZWISCHEN STEROIDEN NACHWEISEN ?

3.1. Wird der Redoxquotient Östradiol / Östron durch 20-Hydroxysterioide beeinflusst ?

Die enzymatische Reduktion von Östron wird in der Leber durch die mikrosomale und cytoplasmatische 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert. Die dabei benötigten Coenzyme sind NADH und NADPH (24). Dementsprechend müßte der Quotient des Redoxsystems Östradiol / Östron durch alle Substrate gleichermaßen beeinflusst werden, die in der Leberzelle NADH oder NADPH erzeugen können. Somit stände nämlich das Redoxsystem Östradiol / Östron im Gleichgewicht mit dem NADH / NAD- bzw. NADPH / NADP-System. Daraus ergibt sich die Frage:

Welchen Einfluß haben verschiedene NADH oder NADPH erzeugende Steroide und Nichtsterioide auf das Verhältnis E_2 / E_1 in der Rattenleber?

Aus *Abbildung 7* (Kapitel C 2.2.) geht hervor, daß eine Tritiumübertragung von $[17\alpha\text{-T}]\text{Östradiol}$ auf $5\beta\text{-Pregnan-20-on}$ zu erkennen ist. Ebenso wird umgekehrt Östron zu Östradiol reduziert, wenn als Wasserstoffdonator $[20\alpha\text{-T}]\text{Progesterol}$ eingesetzt

wird (57). Aus dem Wechselspiel des Wasserstoffweges von C-17 $\rightarrow$ C-20 bzw. C-20 $\rightarrow$ C-17 lassen sich gegenseitige Beeinflussungen des Redoxstatus am C-20 bzw. C-17 vermuten.

Ohne Zusatz weiterer Substanzen (entspricht Kontrollversuch in *Tabelle 6*) findet man in Leberschnitten weiblicher Ratten sowohl nach Inkubation von $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ als auch nach Inkubation mit $[4-^{14}\text{C}]\text{Östradiol}$ im Gleichgewicht einen E_2 / E_1 -Quotienten von 0.09 bis 0.13. Dieses Gleichgewicht ist unter den Versuchsbedingungen gemäß *Tabelle 6* etwa in 2 min erreicht und bleibt dann bis zu 20 min konstant.

Wir sehen, daß dieser E_2 / E_1 -Quotient erwartungsgemäß durch Substrate, die selbst unter Wasserstoffabgabe oxidiert werden können, erhöht wird. Jedoch ist der Effekt verschiedener 20-Hydroxysteroiden nicht sehr ausgeprägt (maximale Erhöhung des Quotienten auf das 2.2fache), wenn man als Vergleich die Auswirkung von Testosteron auf die Gleichgewichtslage von Östradiol / Östron heranzieht (56). So erhöht unter sonst gleichen Bedingungen 10 $\mu\text{mol/l}$ Testosteron den E_2 / E_1 -Quotienten um den Faktor 18, während der Zusatz der gleichen Progesterolkonzentration den Faktor lediglich um 1.4 erhöht.

Bei der Inkubation von Schnitten männlicher Rattenleber mit Östradiol bzw. Östron stellt sich ein höherer E_2 / E_1 -Quoti-

TAB. 6 : REDOXQUOTIENT E_2/E_1 IN WEIBLICHER UND MÄNNLICHER RATTENLEBER BEI ANWESENHEIT VON
20-HYDROXYSTEROIDEN

100 mg Leberschnitte werden in 3.1 ml Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7.4, mit $4 \cdot 10^{-7}$ mol/l Östron und 10^{-5} mol/l Hydroxysteroid 10 min bei 37°C inkubiert. n = 4

20-Hydroxysteroid	♀		♂	
	E_2/E_1 -Quotient	Faktor	E_2/E_1 -Quotient	Faktor
Kontrolle	0.13 ± 0.05	1.00	0.20 ± 0.08	1.00
20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-on	0.17 ± 0.04	1.31	0.22 ± 0.08	1.10
20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-on [10^{-4} mol/l]	0.28 ± 0.09	2.15	"	-
5 α -Pregnan-3 α ,20 β -diol	0.15 ± 0.01	1.15	0.25 ± 0.04	1.25
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0.22 ± 0.01	1.69	0.26 ± 0.01	1.30

ent ein als in der weiblichen Rattenleber. Nach Zusatz von 20-Hydroxysteroiden wird auch in der männlichen Rattenleber das Gleichgewicht Östradiol / Östron auf die reduzierte Seite verschoben. Der Einfluß ist zwar noch niedriger als in der weiblichen Rattenleber, aber dennoch durchaus meßbar (siehe *Tabelle 6*).

Die Abhängigkeit des E_2 / E_1 -Quotienten in der weiblichen Rattenleber von der Progesterolkonzentration ist in *Abbildung 8* dargestellt. Deutlich ist die Empfindlichkeit des Quotienten gegenüber geringen Progesterolkonzentrationen zu erkennen. Übersteigt dieser den Wert $100 \mu\text{mol/l}$ ist nur noch eine geringe Erhöhung des Quotienten E_2 / E_1 zu verzeichnen.

Dieser ist ebenfalls von der Gewebemenge abhängig. Mit Zunahme der Gewebemenge erhöht sich das Verhältnis Östradiol / Östron, während der Einfluß der 20-Hydroxysteroiden bei 100 mg Leber am ausgeprägtesten ist. Die Verschiebung des E_2 / E_1 -Quotienten durch 20-Hydroxysteroiden als Funktion der Gewebemenge zeigt *Abbildung 9*.

Die Besonderheit des spezifischen Wasserstofftransfers zwischen Steroiden beruht darauf, daß die bei der Oxidation von Hydroxysteroiden gebildeten reduzierten Pyridinnukleotide nicht-korrespondierende Oxosteroiden eher als andere reduzierbare Substrate hydrieren (33 - 40, 56).

ABB. 8 : EINFLUSS VON PROGESTEROL AUF DEN E_2/E_1 -QUOTIENTEN

100 mg Leberschnitte von erwachsenen Ratten (♀) werden in 3.2 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7.4, mit $[^{14}\text{C}]$ -Östron ($2 \cdot 10^{-7}$ mol/l) 10 min bei 37°C unter Zusatz steigender 20β -Hydroxy-4-pregnen-3-on-Konzentration inkubiert. Mittelwerte von Doppelbestimmungen

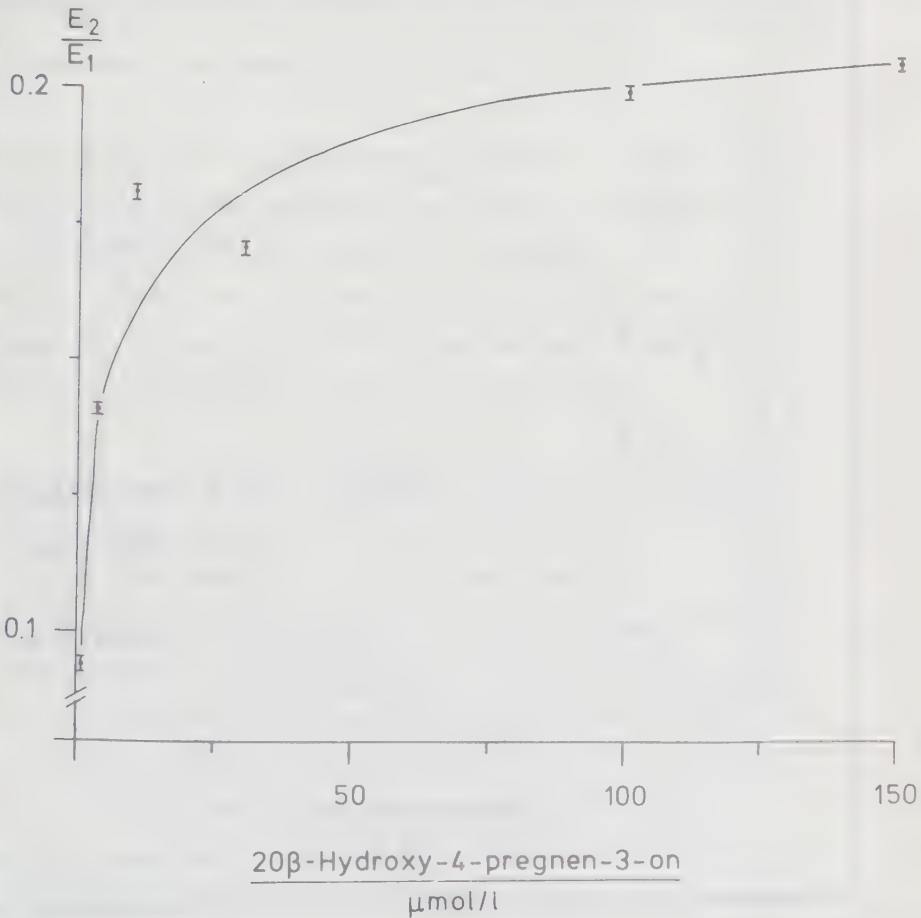
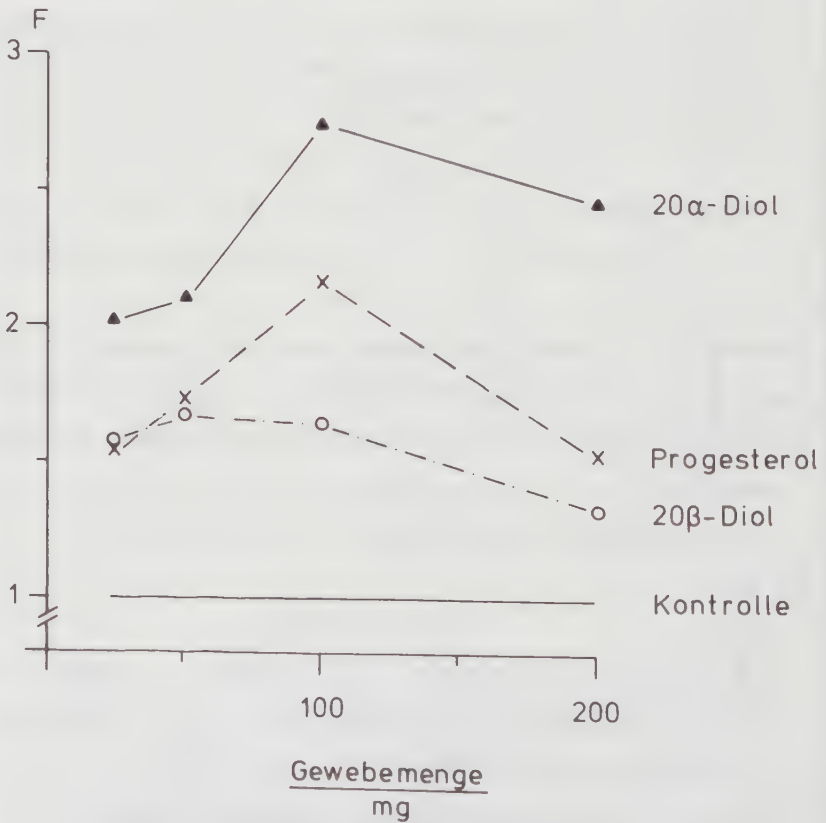


ABB. 9: EINFLUSS VON 20-HYDROXYSTEROIDENAUF DEN E_2/E_1 -
QUOTIENTEN IN RATTENLEBER ($\circ$), F (GEWEBEMENGE)
+

Leberschnitte erwachsener Ratten ($\circ$) werden in 3.2 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7.4, mit $[^{14}\text{C}]$ -Östron ($2.4 \cdot 10^{-7}$ mol/l) unter Zusatz von 20-Hydroxysteroiden (10^{-5} mol/l) 10 min bei 37°C inkubiert. Mittelwerte von Doppelbestimmungen



Durch diesen Mechanismus lassen sich Regulationsvorgänge der Steroidhormone ableiten. Bei Anwesenheit von 20-Hydroxysteroiden wird mehr Östron reduziert als bei Anwesenheit von anderen wasserstoffliefernden Substraten, wie z.B. Lactat.

Dies allein beweist schon, daß der Weg des Wasserstoffs bei Oxydoreduktionen von Steroiden nicht identisch sein kann mit anderen Redox-Stoffwechselvorgängen in der Leber.

Wie im Kapitel C 1. beschrieben, sind für den spezifischen Wasserstofftransfer zwischen Steroiden nur die Steroid-Dehydrogenasen und nicht irgendwelche Transhydrogenasen verantwortlich. Daher ist auch verständlich, daß die 20-Hydroxysteroidoide auf die Östronreduktion keinen so großen Einfluß haben, wie ihn beispielsweise Testosteron ausübt (56).

Zwar scheinen einige Steroid-Dehydrogenasen eine gewisse Substratspezifität zu besitzen, womit der nicht-positionsspezifische Wasserstoffübergang zwischen Steroiden erklärlich ist. So konnte aus der menschlichen Placenta eine lösliche 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase angereichert werden, die auch eine gewisse 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität besitzt (61). Diese ist allerdings sehr gering. Der K_m -Wert für Progesteron ist um den Faktor 32 größer als für Östron. Neuere Ergebnisse zeigen, daß diese Befunde auf nicht genügende Separierung der Enzyme zurückzuführen sind. Mit verbesser-

ten Anreicherungsverfahren erhaltene 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Humanplacenta zeigt keinen Progesteronumsatz zu 20α -Hydroxy-4-pregnen-3-on (62).

Der wesentlich geringere Einfluß von 20-Hydroxysteroiden als von 17-Hydroxysteroiden auf das E_2 / E_1 -Verhältnis scheint konsequent. Die 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen vermögen nur in geringerem Umfang die 20-Hydroxygruppe zu oxidieren als die 17-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen die 17-Hydroxygruppe (63, 64). Wird z.B. 20β -Hydroxy-4-pregnen-3-on an der 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oxidiert, muß das entstandene NADH vom Enzymprotein dissoziieren und sich an die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase anlagern. Erst dann kann Östron reduziert werden. Bei diesen diffusiblen Vorgängen der reduzierten Pyridinnukleotide zwischen den beiden Enzymen kann sich jedoch das NADH mit dem Pool des freien NADH vermischen, so daß der Weg der spezifischen Wasserstoffübertragungen unterbrochen ist.

Trotz des geringen Ausmaßes des Tritiumtransfer $C-20 \rightarrow C-17$ nimmt auch hier der Steroidwasserstoff eine besondere Stellung ein. Dies entnehmen wir aus folgenden zwei Tatsachen

1. Erst ein 100facher Überschuß an Lactat gegenüber 5α -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol hat auf die Östronreduktion den gleichen Effekt (56).

2. Für die Reduktion von Östron stellt 20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-on über 10mal mehr Wasserstoff zur Verfügung als Isocitrat (57, Seite 56 f.).

Berücksichtigt man diese beiden Punkte, ist verständlich, daß trotz des geringen Einflusses von 20-Hydroxysteroiden auf das E_2 / E_1 -Verhältnis der spezifische Wasserstofftransfer gut zu erkennen ist.

3.2. Wie beeinflussen Wasserstoffdonatoren den Redoxquotienten Progesterol / Progesteron in männlicher und weiblicher Rattenleber?

Im Kapitel C 3.1. haben wir die Auswirkung des Wasserstofftransfers zwischen Steroiden auf das Redoxgleichgewicht Östradiol / Östron untersucht. Dabei zeigen 17-Hydroxysteroidoide eine größere Verschiebung des Gleichgewichtes als 20-Hydroxysteroidoide (56). Da als Ursache für den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden eine langsame Dissoziation des binären NADH-Dehydrogenasen-Komplexes im Vergleich zur Dissoziation der Steroids substrate angenommen wird (33), ist die besondere Auswirkung von 17-Hydroxysteroiden auf das E_2 / E_1 -Verhältnis verständlich. Aus diesen Erkenntnissen läßt sich dann umgekehrt ableiten, daß der Redoxstatus an C-20 von Pregnanderivaten durch 20-Hydroxysteroidoide stärker beeinflußt werden muß als durch 17-Steroidalkohole. Deshalb untersuchen wir die

Reduktion am C-20 des Progesterons unter dem Einfluß von Hydroxysteroiden in der Rattenleber.

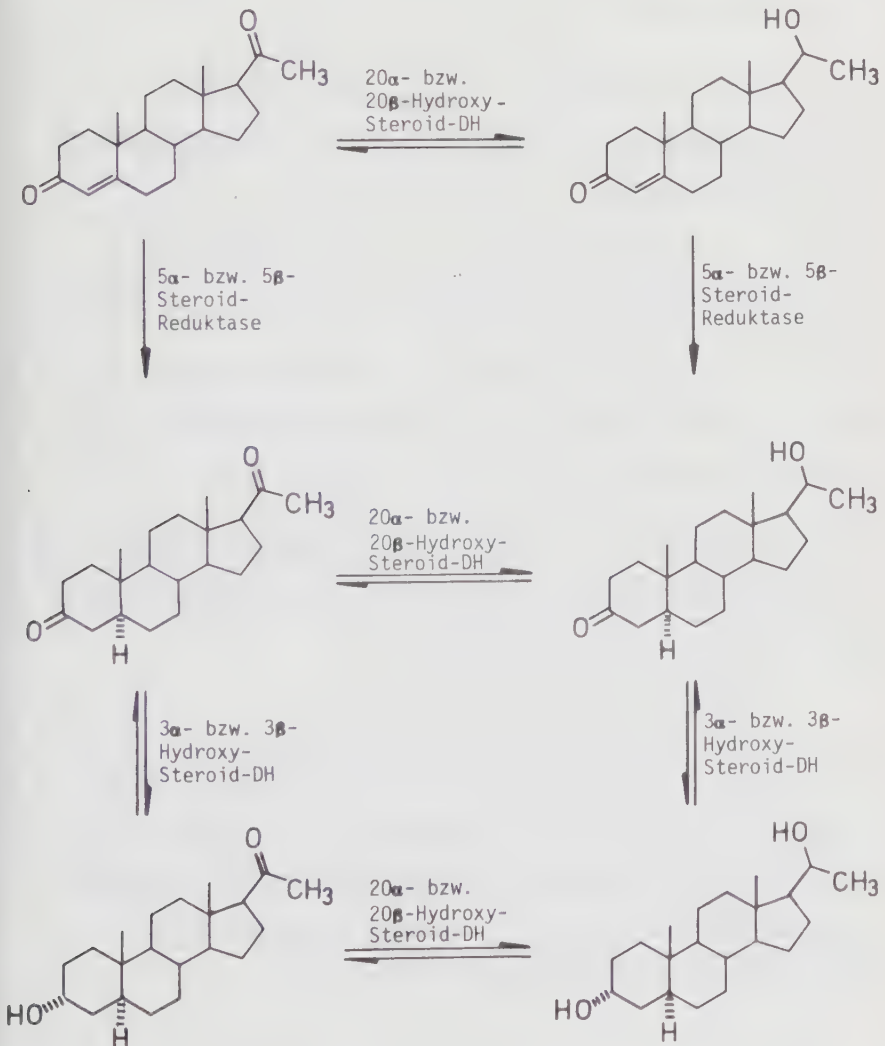
Bei dieser Versuchsanordnung ist jedoch zu berücksichtigen, daß mehrere Enzyme Progesteron an verschiedenen Stellen reduzieren können.

1. Die Δ_{4-5} -Steroid-Reduktasen
2. Die 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
3. Die 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Da wir auf Grund der Problemstellung jedoch nur den Redoxstatus am C-20 - gleichgültig, ob 20 α - oder 20 β -Reduktionsprodukte entstehen - untersuchen wollen, stört die Parallelität der beiden 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen nicht. Kompliziert wird es, wenn man die Aktivitäten der Δ_{4-5} -Steroidreduktasen berücksichtigt. Sie besitzen nämlich eine größere Aktivität als z.B. die 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. So besteht in der weiblichen Rattenleber zwischen der Reduktion des Ringes A und der Reduktion der Steroidseitenkette an C-17 ein Verhältnis von 3.4 : 1 (65, 66).

Die Komplexität der verschiedenen reduktiven Progesteronstoffwechselprozesse erläutert *Abbildung 10*.

ABB. 10: PROGESTERON-METABOLISIERUNG DURCH
STEROIDDEHYDROGENASEN



Für unsere Untersuchungen ziehen wir deshalb lediglich das nach der Inkubation tatsächlich quantitativ bestimmbare Progesterol und Progesteron heran und lassen alle weiteren Metaboliten außer acht.

Tabelle 7 zeigt, daß bei der Inkubation von Schnitten weiblicher Rattenleber mit Progesteron ein Teil des Substrates an der 20-Ketogruppe reduziert wird. Es errechnet sich ein Progesterol / Progesteron-Quotient von 0.11. Dieser Quotient wird nun nach Zugabe von 20-Hydroxysteroiden erhöht. Der Einfluß dieser Wasserstoffdonatoren ist verglichen mit der Auswirkung von Testosteron auf das E_2 / E_1 -Verhältnis (56) nicht sehr hoch. Jedoch bewirken hier andere 17 β -Hydroxysteroiden als Testosteron auch nur eine unwesentlich größere Verschiebung des E_2 / E_1 -Quotienten zur reduzierten Seite, als in *Tabelle 7* gezeigt wird. So erhöht 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol das E_1 / E_2 -Verhältnis um den Faktor 2.6 und 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol um den Faktor 2.9 (56).

Da bei der Progesteron-Reduktion verschiedene Enzyme gleichzeitig Wasserstoff in das Substrat einführen können, wobei die Δ_4 -Steroid-Reduktasen die größte Aktivität besitzen, versuchen wir, diesen "Nebenweg" auszuschalten. Deshalb setzen wir unter ansonsten völlig identischen Bedingungen als Oxosteroid 5 α -Pregnan-3,20-dion ein (*Tabelle 8*).

TAB. 7: PROGESTEROL/PROGESTERON-BEEINFLUSSUNG DURCH
20-HYDROXYSTEROIDE IN WEIBLICHER RATTENLEBER

100 mg Leberschnitte von Rattenweibchen werden in 3.1 ml Phosphat-Puffer, pH 7.4, mit Progesteron ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und 10^{-5} mol/l 20-Hydroxysteroid bei 37°C 5 min inkubiert.
n = 4 * p < 0.005

20-Hydroxysteroid	Quotient	Faktor
	Progesterol / Progesteron	
Kontrolle	0.11 ± 0.03	1.00
5α-Pregnan-3α,20β-diol	0.12 ± 0.04	1.09
5α-Pregnan-3α,20α-diol	0.27 ± 0.03*	2.45

TAB. 8: VERSCHIEDENE 20-OL / 20-ON - QUOTIENTEN IN
RATTENLEBER (♀)

100 mg Leberschnitte erwachsener Rattenweibchen werden in 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer mit $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l 20-Ketosteroid bei 37°C 5 min inkubiert. n = 2

Ketosteroid	Quotient	Vergleich
	20-ol / 20-on	
Progesteron	0.11 ± 0.03	1.00
5α-Pregnan-3,20-dion	0.63 ± 0.06	5.73

Bei diesem Steroid stellt sich ein wesentlich höherer Quotient $20\text{-ol} / 20\text{-on}$ ein. Dies ist u.a. auf die geänderte Struktur des Substrates zurückzuführen. Von der ovariellen 20α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Ratte ist bekannt, daß sie mit 5β -Pregnanderivaten schneller reagiert als mit 5α -Pregnanen (67). Ob diese Verhältnisse im Ovar auf unsere Reaktion in der Leber ohne weiteres übertragbar ist, muß noch offen bleiben.

Während beim Einsatz von Progesteron als Oxosteroid der größere Teil der Reduktionsäquivalente die 4-en -Gruppe hydriert, können diese nun vermehrt die 20 -Ketogruppe reduzieren. Dies ist auch verständlich, zumal bei der 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase die Gleichgewichtslage weit auf der reduzierten Seite liegt (68).

Der Redoxstatus an C-20 wird durch Progesterol ebenso erhöht wie der Progesterol / Progesteron-Quotient durch 20 -Hydroxysterioide (Tabelle 9).

Vergleicht man alle untersuchten 20 -Hydroxysterioide bezüglich ihrer Auswirkung auf den Redoxstatus an C-20 bei Progesteron bzw. 5α -Pregnan- $3,20$ -dion, so fällt auf, daß das 20α -Hydroxysteroid das Gleichgewicht mehr auf die reduzierte Seite verschiebt als 20β -Hydroxysterioide. Hierfür machen wir unterschiedliche Enzymaktivitäten und Affinitäten der verschiedenen Sub-

TAB. 9: BEEINFLUSSUNG DES REDOXSTATUSES AN C-20 BEI
5 α -PREGNAN-3,20-DION DURCH HYDROXYSTEROIDE
IN RATTENLEBER (♀)

In 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer werden 100 mg ♀ Rattenleberschnitte mit 5 α -Pregnan-3,20-dion ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und 10^{-5} mol/l Hydroxysteroid 5 min bei 37°C inkubiert.
pH 7.4

Hydroxysteroid	Quotient	
	20-ol / 20-on	Faktor
Kontrolle	0.63 ± 0.06	1.00
20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-on	0.88 ± 0.11	1.40
Östradiol	0.70 ± 0.09	1.11
Dihydrotestosteron	0.71 ± 0.02	1.13

TAB. 10: BEEINFLUSSUNG DES QUOTIENTEN PROGESTEROL/PROGESTERON DURCH 17-HYDROXYSTEROID IN RATTENLEBER (♀)

In 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.4, werden 100 mg Leberschnitte erwachsener Rattenweibchen mit Progesteron ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und Hydroxysteroiden (10^{-5} mol/l) bei 37°C 5 min inkubiert. n = 4 * p < 0.001

17-Hydroxysteroid	Quotient	
	Progesterol / Progesteron	Faktor
Kontrolle	0.11 ± 0.03	1.00
Östradiol	0.79 ± 0.08 *	7.02
Dihydrotestosteron	0.35 ± 0.07 *	3.06

strate zum Enzymprotein verantwortlich.

Da 20-Hydroxysteroidoide nur eine geringe Auswirkung auf den Redoxstatus an C-20 zeigen, ist zu erwarten, daß 17-Hydroxysteroidoide ihn noch weniger verschieben. Dies steht dann in Einklang mit den Befunden über den bevorzugten Wasserstofftransfer zwischen Steroiden (33) und entspricht den Ergebnissen über den Einfluß verschiedener Hydroxysteroidoide auf das E_2 / E_1 -Verhältnis (56).

Gemäß *Tabelle 10* reduzieren wider Erwarten Östradiol und Dihydrotestosteron Progesteron stärker als die 20-Hydroxysteroidoide, während die Beeinflussung des 20-ol / 20-on-Quotienten bei 5 α -Pregnan-3,20-dion nur gering ist (*Tabelle 9*).

Auffallend ist die herausragende Wirkung von Östradiol und Dihydrotestosteron auf die Progesteronreduktion. Dies ist nicht in Einklang zu bringen mit den Befunden über den bevorzugten Wasserstofftransfer zwischen Steroiden.

Wenn wir davon ausgehen, daß die enzymatische Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden an dem Dehydrogenasenprotein vollzogen wird, müssen wir die unterschiedlichen Enzymaktivitäten der Steroid-Dehydrogenasen in Betracht ziehen (21, 22, 24, 63, 64, 89).

Bei der Progesteronreduktion an C-20 durch die 17-Hydroxysteroid-
 roide wirken drei Enzyme zusammen, wenn wir eine gewisse Un-
 spezifität unberücksichtigt lassen. Die 17 β -Hydroxysteroid-
 Dehydrogenase oxidiert die NADH-Generatoren, und die 20 α - bzw.
 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase reduzieren Progesteron. Das
 an der 17-Dehydrogenase gebildete NADH muß zunächst von dem
 Enzym dissoziieren und kann sich erst dann an das hydrierende
 Enzym anlagern. Bei diesen Diffusionsvorgängen erreicht der
 Steroidwasserstoff den Pool der freien Pyridinnukleotide. Daß
 dennoch ein so großer Teil des vom Östradiol stammenden Was-
 serstoffs zu den 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen gelangt,
 führen wir auf eine räumliche Nähe der verschiedenen Steroid-
 Dehydrogenasen in der Leberzelle zurück. Weiterhin ist denk-
 bar, daß in dem endoplasmatischen Retikulum die Enzyme nach
 Funktionseinheiten geordnet sind. Eine dieser Einheiten be-
 stände dann aus den Steroid-Dehydrogenasen, die die Coenzyme
 sich gegenseitig "zureichen", ehe sie in den übrigen zellulären
 Raum gelangen. Auf Grund dieser Vorstellungen kann man ent-
 gegen den Befunden über den bevorzugten Wasserstofftransfer
 zwischen Steroiden den besonderen Einfluß von Östradiol und
 Dihydrotestosteron auf die Reduktion von Progesteron erklären.

Außerdem muß bei der Suche nach Erklärungen für die starke
 Beeinflussung des Progesterol / Progesteron-Verhältnisses
 durch die 17-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen die Gleichgewichtslage unter den
 verschiedenen Steroid-Dehydrogenasen beachtet werden. So liegt

das Gleichgewicht der 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen auf der Seite des jeweiligen Steroidalkohols (68, 69). Bei den 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen ist es auf der Seite der Ketoverbindung. Dies kann man u.a. aus dem Kontrollwert des E_2 / E_1 -Quotienten erkennen. Die Oxidation des Östradiols bzw. Dihydrotestosterons erfolgen in Richtung auf das Gleichgewicht und umgekehrt die Progesteronreduktion ebenfalls in Richtung auf das Gleichgewicht. Da also die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen eine größere Enzymaktivität besitzen, wird durch die Steroidoxidation auf der einen Seite mehr NADH gebildet, als auf der anderen Seite zur Reduktion am zweiten Enzym benötigt wird. Vielleicht ist auch das hohe NADH-Anfluten verbunden mit einer räumlichen Nähe der verschiedenen Steroid-Dehydrogenasen für die besondere Stellung des Östradiols zur Progesteronreduktion verantwortlich.

3.3. Einfluß von Nicht-Steroiden

Im vorhergehenden Kapitel haben wir die Verschiebung des Redoxstatus an C-20 von Pregnanderivaten in der weiblichen Ratte unter dem Einfluß von Hydroxysteroiden gesehen. Dies entspricht dem bevorzugten Wasserstofftransfer zwischen Steroiden. Da dort jedoch wider Erwarten die 17-Hydroxysteroiden eine größere Beeinflussung als die 20-Hydroxysteroiden bewirken.

TAB. 11 : QUOTIENT PROGESTEROL/PROGESTERON IN RATTENLEBER
(♀) NACH LACTAT- BZW. GLUTAMAT-ZUGABE

In 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer werden 100 mg Rattenleberschnitte (♀) mit Progesteron ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) nach Zugabe von Lactat oder Glutamat bei 37°C 5 min inkubiert. n = 2

H ₂ -Donator	Quotient Progesterol / Progesteron	Faktor
Kontrolle	0.11 ± 0.03	1.00
Lactat : 10^{-5} mol/l	0.07 ± 0.01	0.64
10^{-7} mol/l	0.11 ± 0.02	1.00
Glutamat: 10^{-5} mol/l	0.07 ± 0.01	0.64
10^{-7} mol/l	0.11 ± 0.03	1.00

Besitzen oxidierbare Nicht-Steroide eine ähnliche Wirkung auf die Progesteronreduktion wie Steroidalkohole?

Gemäß *Tabelle 11* reduzieren Lactat und Glutamat Progesteron nicht, vielmehr scheinen sie sogar eine Progesteronreduktion zu hemmen. Selbst ein 2000facher Überschuß an Lactat bzw. Glutamat bewirkt keine intensivere Reduktion der Ketogruppe.

Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal die Besonderheit des Wasserstoffs, der von einem Steroid stammt. Sie beweisen außerdem, daß Steroidwasserstoff bevorzugt Oxosteroide reduziert, bevor er sich mit dem Pool der reduzierten Pyridinnukleotide vermischt. Daraus können sich interessante endokrinologische Wirkungen ableiten lassen.

3.4. Ändert sich die Redoxlage an C-20 in der geschädigten Leber?

Zu den starken Lebergiften zählt Tetrachlorkohlenstoff. Bisherige Untersuchungen lassen eine Schädigung des Leberparenchyms (70) und des endoplasmatischen Retikulums (71) vermuten sowie eine Störung der Proteinbiosynthese (72). Weiterhin hat CCl_4 Einfluß auf die Biosynthese der Pyridinnukleotide in der oxidierten und reduzierten Form (73). So sinkt nach ein-

TAB. 12 : BEEINFLUSSUNG DES QUOTIENTEN 20-OL / 20-ON DURCH HYDROXYSTEROIDE IN DER

GESUNDEN UND GESCHÄDIGTEN RATTENLEBER (♀)

100 mg weiblicher Rattenleber werden in 1.1 ml 0.1 N Trisphosphat-Puffer mit 0.1 mg Pregnen-3,20-dion ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) und 10^{-5} mol/l Hydroxysteroid 5 min bei 37° inkubiert. n = 2

	gesunde Leber		geschädigte Leber	
	Quotient 20-ol / 20-on	Faktor	Quotient 20-ol / 20-on	Faktor
Kontrolle	0.63 ± 0.06	1.00	0.31	0.06 *
20β-Hydroxy-4-pregnen-3-on	0.38 ± 0.11	1.46	1.63	0.04 *
Östradiol	0.70 ± 0.09	1.11	1.43	0.1 *
Dihydrotestosteron	0.71 ± 0.02	1.13	0.56	0.08

* p < 0.05

maliger Tetrachlorkohlenstoffgabe der NAD-Gehalt pro Gramm Rattenleber um 18.3 % (74). Infolge Membranschädigungen am endoplasmatischen Retikulum und an den Mitochondrien der Leberzellen kommt es bei CCl_4 -Intoxikationen zur Enzymfreisetzung - z.B. von LDH - aus Zellen und Zellorganellen (70). Dies macht sich dann auch in einer Minderung der Aktivität mikrosomaler Leberenzyme bemerkbar, die Arzneimittel abbauen (unspezifische Hydroxylasen) (75, 76).

Gemäß *Tabelle 12* ist zunächst auffallend, daß in der CCl_4 geschädigten Rattenleber die Reduktion der 20-Ketogruppe auf etwa die Hälfte herabgesetzt ist. Dies ist erklärlich, da ja die Biosynthese der Pyridinnukleotide gestört ist und somit weniger zelluläre Reduktionsäquivalente vorhanden sind. Dagegen verschiebt Progesteron den Quotienten 20-ol / 20-on um den Faktor 3.8 mehr auf die reduzierte Seite als in der Normalleber. Östradiol und Dihydrotestosteron besitzen eine geringere Wirkung. Dennoch ist der Effekt noch wesentlich höher als in der ungeschädigten Leber.

3.5. Der Progesteron / Progesteron-Quotient im Rattenovar

Die Leber ist das Organ, in dem ein Großteil der im Blut zirkulierenden Steroide verstoffwechselt wird. Sie üben hier keine hormonelle Wirkung aus. Außer der Leber besitzen noch

weitere Organe Enzyme oder Enzymsysteme, die teilweise Stoffwechselfunktionen wahrnehmen. Daher ist anzunehmen, daß manche enzymatische Reaktionen der Leber in ähnlicher Weise in anderen Organen ablaufen.

Wird in Niere, Vagina, Uterus und Ovar der Quotient Progesterol / Progesteron ebenfalls durch Hydroxysterioide erhöht?

Die Klärung dieser Frage ist deshalb von Interesse, weil in Uterus, Vagina und Ovar als Erfolgsorgane des Progesterons die endogene Hormonkonzentration höher ist als in der Leber und daher eine vermehrte Progesteronreduktion gleichzeitig eine Minderung der Hormonwirkung bedeutet.

Nach *Tabelle 13* ist eine Beeinflussung nur im Ovar zu erkennen. In der Niere, Uterus und Vagina zeigen sich keine Effekte. Östradiol fungiert für den reduktiven Progesteronstoffwechsel in den Ovarien als Wasserstoffdonator. Allerdings fällt der größere Effekt von 5α -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol auf. Diese Substanz reduziert nämlich Progesteron um den Faktor 2.8 mehr als Östradiol.

Bei unseren Versuchen mit Rattenovarien haben wir auf eine Cycluskontrolle der Versuchstiere verzichtet und Ovary aller Cyclusstadien zu den einzelnen

Ansätzen gegeben. Wir können so verfahren, da sich der T-Transfer zwischen Östradiol und Progesteron in Abhängigkeit vom Cyclusstadium des Ovars nur um den Faktor 2.2 ändert (78).

Das Rattenovar besitzt eine spezifische 20α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit großer Substratspezifität (69, 78 - 82). Die Enzymaktivität pro mg Gewebe ist im Ovar größer als in der Leber. Dagegen verhält sich die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase genau umgekehrt. Diese besitzt in der Leber die größere Aktivität. Bewiesen wird dies unter anderem durch die Wasserstoffübertragung von Östradiol auf 5α -Androst-3-en-17-on (37). In der Leber wird das Oxosteroid zu 19 % von dem Östradiolwasserstoff reduziert, während in dem Ovar dies nur zu 2.5 % erfolgt. Ferner werden in der Leber 62.5 % des Wasserstoffs vom Östradiol zu Wasser oxidiert und in dem Ovar nur zu 4 %.

Zieht man diese Befunde bei der Interpretation der Ergebnisse nach *Tabelle 13* in Betracht, wird erklärlich, warum Progesteron durch Wasserstoff von 20α -Hydroxysteroiden stärker reduziert wird als durch Wasserstoff von 17-Hydroxysteroiden.

Hier nicht weiter angegebene Versuche mit 20β -Steroidalkoholen zeigen keinerlei Verschiebung des Redoxstatus an C-20 im Ovar.

Dies ist verständlich, da im Ovar nur die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vorkommt.

TAB. 13 : VERSCHIEBUNG DES QUOTIENTEN PROGESTEROL/PROGESTERON
IM RATTENOVAR

30 mg Ovarschnitte (gleichmäßige Mischung aus allen Östrus-Phasen) werden in 3.1 ml 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.4, mit $3.0 \cdot 10^{-7}$ mol/l Progesteron unter Zusatz von Östradiol bzw. 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol (je 10^{-5} mol/l) 5 min bei 37°C inkubiert. n = 2

Hydroxysteroid	Quotient Progesterol/Progesteron	Faktor
Kontrolle	0.07 $\pm$ 0.01	1.00
Östradiol	0.09 $\pm$ 0.01	1.29
5 α -Pregnan- 3 α ,20 α -diol	0.27 $\pm$ 0.02 *	3.86

* p < 0.01

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. WASSERSTOFFÜBERTRAGUNGEN ZWISCHEN STEROIDEN MIT KRISTALLINER 20 β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen ist das Phänomen des bevorzugten Wasserstofftransfers zwischen Steroiden. Bei den bisherigen Untersuchungen über die enzymatische Wasserstoffübertragung werden als Enzymquelle bevorzugt Rattenleber oder Rattenleberfraktionen herangezogen. Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan enthält eine Vielzahl an Enzymen, die zum Teil mit den gleichen Substraten und den gleichen Coenzymen reagieren. Daher ist eine abschließende Aussage, welche Enzyme die Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden katalysieren, bislang noch nicht getroffen worden. Zwar wird sie den Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zugeschrieben, jedoch sind endgültige Aussagen nur mit isolierten, kristallinen Enzymen möglich.

Die reine 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans* erweist sich für unsere Versuche zu Wasserstoffübertragungen als günstiges "Modellenzym". Einmal, weil es Steroidalkohole oxidiert und Ketosteroide reduziert, zum anderen, weil es mit mehreren Hydroxy-/Oxosteroidpaaren reagiert, und zum dritten, weil ihre Katalyse streng stereospezifisch ist.

Diese Eigenschaften des Enzyms werden z.B. zur Synthese von 20 α -T-markierten 20 β -Hydroxysteroiden mit NADT (83, 84) oder zur Identifizierung von geringen Steroidmengen im Serum ausgenutzt (85).

Ein oder zwei Enzyme für die Wasserstoffübertragung?

Wir beweisen in dieser Arbeit, daß allein die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ohne Kooperation mit einem weiteren Enzym einen enzymatischen Wasserstofftransfer zwischen einem Hydroxy- und einem Ketosteroid katalysiert (siehe Kapitel C 1.). Zwar ist das Ausmaß dieser Tritiumübertragung am C-20 zwischen Hydroxy-/Oxosteroidpaaren - ausgedrückt als Wiederfindung des auf den Akzeptor übernommenen Donatorwasserstoffs - mit maximal ca. 18 % geringer als der Transfer an C-17 in der Rattenleber. Hier kann er bis über 50 % betragen (Tabelle 2 in 58). Ein Vergleich dieser relativen Werte führt nicht zu Aussagen über die Effizienz dieser Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden. Will man Aussagen treffen, müssen mehrere Parameter beachtet werden.

Der Tritiumtransfer ist die Resultante zweier im Prinzip getrennt ablaufender Umsetzungen am Enzymprotein. Zunächst muß das Hydroxysteroid unter Bildung von reduziertem Coenzym oxidiert werden. Dieses reduziert anschließend das Ketosteroid. Beide Reaktionen haben unterschiedliche pH-Optima. Die Oxidation ist bei einem

hohen pH-Wert begünstigt, während niedrige pH-Werte die Reduktion beschleunigen. So liegt das Optimum der Oxidation von 20 β -Steroidalkoholen durch die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zwischen pH 8.0 und 8.5 und das der Reduktion von 20-Ketosteroiden zwischen pH 5.0 und 5.5 (85).

Bei der Diskussion unserer Ergebnisse ist eine Eigenschaft der kristallinen Dehydrogenase besonders zu beachten. Während für eine schnelle Hydrierung der Ketosteroide am pH-Optimum nur ein geringer Überschuß an NADH erforderlich ist, müssen 15 Äquivalente NAD eingesetzt werden, um bei pH 8.5 1 Äquivalent Hydroxysteroid in 2 h quantitativ zu oxidieren (85).

Diese Eigenschaften des Enzyms spiegeln sich in unseren Ergebnissen wieder. Unter allen gewählten Bedingungen finden wir nicht-oxidierten Donator in Abhängigkeit vom pH des Mediums und von der Coenzymkonzentration. Nach *Abbildung 2* wird bei einem 100fachen Überschuß des Coenzyms gegenüber Donatorsteroid bei pH 5.2 das Hydroxysteroid bis zum Faktor 2.6 weniger oxidiert als bei pH 8.2. Andererseits ist unter gleichen Bedingungen eine 8.2fach höhere Akzeptorreduktion bei pH 5.2 zu erkennen.

Ähnliches ist auch der *Tabelle 1* zu entnehmen. Wenn NAD in der gleichen Konzentration vorliegt wie der Wasserstoffdonator, wird bei hoher Wasserstoffionenkonzentration der Donator 2.6mal

weniger oxidiert als bei hohem pH-Wert. Andererseits bewirkt eine 100fach erhöhte Coenzymkonzentration bei den untersuchten pH-Werten eine etwa 1.5fach stärkere Donatoroxidation.

Wenn bei diesen Ergebnissen über den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden keine Linearität in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und der Coenzymkonzentration zu erkennen ist, so liegt dies u.a. an der Funktion des Coenzym. Dies vermittelt nur den Wasserstoff zwischen den beiden Hydroxy-/Oxosteroidpaaren. Es ist demnach an oxidativen wie reduktiven Reaktionen beteiligt.

Dennoch ist gut zu erkennen, daß im Prinzip bei diesem Mechanismus des Wasserstoffweges zwei Reaktionen miteinander konkurrieren. Die Akzeptorreduktion ist in jedem Falle ein Kompromiß dieser konkurrierenden Schritte, also eine Funktion der beiden Parameter Coenzymkonzentration und pH-Wert.

Bemerkenswert ist der hohe Anteil reduzierten Coenzym in den Inkubationsansätzen. Hier ist ähnlich wie bei der Donatoroxidation eine Abhängigkeit von der Coenzym- und der Wasserstoffionkonzentration zu finden (siehe *Tabelle 1* und *Abbildung 3*). Jedoch ist nicht ganz einsichtig, warum mit diesem reduzierten Coenzym das angebotene Akzeptorsteroid nicht hydriert wird. Für diesen Befund gibt es zwei Erklärungen:

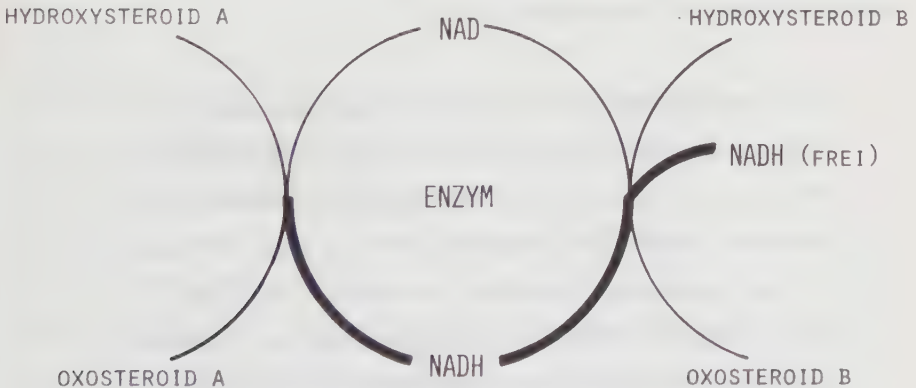
1. Der Donator wird schneller oxidiert als der Akzeptor reduziert.
2. Gebildetes NADH dissoziiert vom Enzymprotein und steht für eine Reduktion nicht zur Verfügung.

Die zweite Erklärung wird unterstützt durch die verminderte Cortisonreduktion mit Zunahme der Vorinkubationsdauer (siehe *Abbildung 4*). Es ist zu erwarten, daß eine Vorinkubation eine Erhöhung der Donatoroxidation bewirkt. Dennoch wird nach der Vorinkubationsphase weniger Cortison reduziert. Dieser Befund stimmt zwar überein mit früheren Ergebnissen zu Wasserstoffübertragungen, widerspricht aber den Aussagen von BETZ und WARREN (48), wonach die Michaelis-Konstante für NADH 10 bis 15mal kleiner ist als für NAD. Danach müßte die Reduktion des Akzeptors erhöht sein. Weil sich nach BETZ und TAYLOR (86) ein Steroid nur an einen bestehenden binären Komplex aus Enzym und Coenzym anlagert, wird es auch nur in einem ternären Komplex reduziert.

Diese Untersuchungen von BETZ und Mitarbeitern sind jedoch unter anderen Bedingungen als unsere durchgeführt worden. Sie arbeiten nur mit einem Hydroxy-/Oxosteroidpaar und leiten daraus ihre Folgerungen ab. Wir betrachten aber bei unseren Versuchen zwei Hydroxy-/Oxosteroidpaare, die sich gegenseitig beeinflussen können. Möglicherweise sind die Assoziations- sowie die Dissoziations- und Diffusionsvorgänge am Enzymprotein in

Gegenwart zweier Steroidpaare anders als bei einem Steroidpaar.

Entscheidend für hohen Anteil reduzierten Coenzyms scheint eine Diskrepanz in der Metabolisierungsgeschwindigkeit von Donator und Akzeptor zu sein. Wird pro Zeiteinheit mehr Donator oxidiert als Akzeptor reduziert, ist unter unseren Bedingungen eine vermehrte NADH-Bildung zu erkennen. Im folgenden *Schema* soll dies verdeutlicht werden.

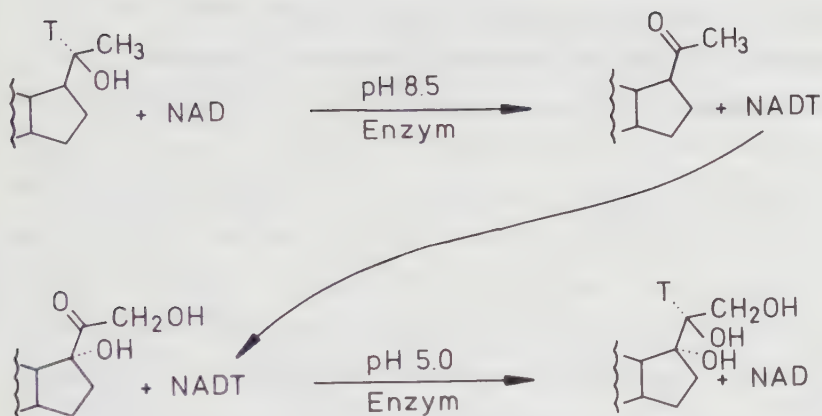


Bei Gewebe als Enzymquelle wird der Wasserstoff aus NADH zu Wasser oxidiert.

Tabelle 2 und Abbildung 2 zeigen eine unterschiedliche Reduktion der angebotenen Ketosteroide. Dies ist u.a. auf verschiedene Affinitäten der Steroide zum Enzymprotein zurückzuführen. Geringe Änderungen im Molekülaufbau haben starken Einfluß auf die Affinität der Steroide. So werden nur 5-trans und nicht 5-cis konfigurierte Steroide von der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase gebunden und deshalb auch reduziert.

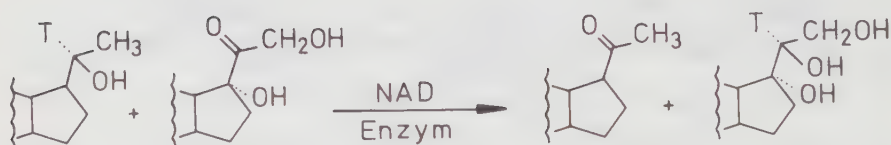
Eine gleiche Affinität der beiden Steroids substrate zum Enzymprotein bedeutet eine höhere Wasserstoffübertragung, als wenn, wie in unserem Falle, der Akzeptor eine geringere Affinität aufweist als der Donator. Bedenkt man diese Aspekte, werden unsere Ergebnisse verständlicher.

Eine Möglichkeit besteht, den Donatorwasserstoff vollständig auf das Akzeptorsteroid zu übertragen. Allerdings muß man von einer "Ein-Stufen-Reaktion" zu einer "Zwei-Stufen-Reaktion" wechseln, die aber keinen Wasserstofftransfer in unserem Sinne bewirkt. Dies sieht dann folgendermaßen aus: Zunächst wird nur der Donator mit NAD bei pH 8.5 bis zur quantitativen Oxidation inkubiert. Anschließend trennt man oxidiertes Donatorsteroid von reduziertem Coenzym. Dies wird darauf bei pH 5.0 mit dem Ketosteroid inkubiert, bis es quantitativ reduziert ist.



Diese Schritte bedeuten zwar im Grunde auch eine Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden, jedoch ist dabei der Weg des spezifischen Wasserstofftransfers unterbrochen. Dieser besteht nämlich darin, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Hydroxy- und eines Ketosteroides die Übertragung am Enzym stattfindet. Diese Konkurrenzschritte laufen bei einer "Zwei-Stufen-Reaktion" nicht ab. Man könnte ebenso auf enzymatischen Wege aus oxidierbaren Nicht-Steroiden NADH gewinnen und damit anschließend ein Ketosteroid reduzieren. In diesem Falle kann man auch von einer enzymatischen Wasserstoffübertragung sprechen.

Um von einer "echten" Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden sprechen zu können, müssen daher in einer "Ein-Stufen-Reaktion" die beiden Steroide um den Wasserstoff konkurrieren.



Mit unseren Ergebnissen zum Wasserstofftransfer zwischen Steroiden beweisen wir mit einer Modellreaktion erstmalig, daß allein ein Enzym, hier die kristalline 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans*, eine derartige Reaktion vermittelt. Gleichzeitig ist damit geklärt, daß die verantwortlichen Enzyme der Wasserstoffübertragung die Steroid-Dehydrogenasen sein können. Diese ist ferner nicht an zelluläre Strukturen oder zelluläre Enzyme gebunden.

Einen ähnlichen Befund liefert POLLOW (87), der aus Humanplacenta eine 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase isoliert und anreichert. Dieses Protein besitzt eine 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität und eine sogenannte "Transhydrogenase-Aktivität". Dieser schreibt er den gemessenen Wasserstofftransfer zwischen Östradiol und 4-Androsten-3,17-dion zu. Wegen unterschiedlicher Werte bei der Charakterisierung der Enzymaktivitäten - u.a. in den Anreicherungsfaktoren - folgert POLLOW, daß das "Transhydrogenase-Enzym" evtl. nicht identisch ist mit der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Diesen Aussagen stehen jedoch eigene Befunde von POLLOW gegenüber (104). Er isoliert aus der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta zwei 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Die eine besitzt eine Östradiolsensitivität, die andere eine Testosteronsensitivität. Nur beide Enzyme zusammen bewirken eine Wasserstoffübertragung zwischen Östradiol und 4-Androsten-3,17-dion. Daher kann aus den Angaben von POLLOW nicht eindeutig gefolgert werden, ob ein oder zwei Enzyme den Wasserstofftransfer bewirken.

Berücksichtigt man diese Gesichtspunkte, kann man nur den Steroid-Dehydrogenasen den wasserstoff-transferierenden Schritt zuschreiben. Dieser ist bei der kristallinen 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase abhängig von

1. der Wasserstoffionenkonzentration,
2. dem Verhältnis NAD/Donator und
3. der Metabolisierungsgeschwindigkeit der Substrate.

2. WASSERSTOFFÜBERTRAGUNG ZWISCHEN STEROIDEN IN DER RATTENLEBER

Obwohl bislang viele Arbeiten zum Wasserstofftransfer zwischen Steroiden erschienen sind (33 - 39, 56, 78, 87, 88, 104), befassen wir uns erstmalig mit einer Wasserstoffübertragung an C-20 von Pregnanen. Progesteron ist der Wasserstoffdonator, dessen Wasserstoff auf 5 β -Pregnan-20-on übertragen werden kann. Dieses Steroid oder dessen reduzierte Form besitzen bekanntlich keine eigene biologische Aktivität.

Wir finden in der weiblichen Rattenleber maximal 17 % des Donatorwasserstoffs im reduzierten Akzeptor wieder. Dieser Wert ist - verglichen mit Wasserstoffübertragungen an C-17 - gering. Verständlich, da die Aktivität der 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, die einen Wasserstofftransfer katalysieren, in der Rattenleber kleiner ist als die der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (63, 64). So geben schwedische Autoren (89) für die Mikrosomenfraktion männlicher Rattenleber eine 1.6fach geringere 20 β - und eine 2.8fach geringe 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenasenaktivität als für die 17 β -Aktivität an. In der weiblichen Rattenleber sind diese Faktoren noch größer (24, 63, 64).

Auf der vorhergehenden Seite sehen wir, daß für einen "optimalen" Tritiumtransfer mehrere Faktoren zu beachten sind. Die angegebenen Punkte sind unter Berücksichtigung der *Abbildungen 5 und 6* und der *Tabelle 5* um zwei zu ergänzen. Eine erhöhte relative Wasserstoffübertragung findet bei großem Akzeptorüberschuß und eine hohe Akzeptorreduktion bei Donatorüberschuß statt.

Die hier angegebenen Befunde beschreiben nur die prinzipiell mögliche Akzeptorreduktion durch Progesterolwasserstoff bei einer Wasserstoffübertragung an C-20. Da ein Akzeptorsteroid eingesetzt wird, das bei der Wasserstoffübertragung an dem kristallinen Enzym wenig reduziert wird, kann sicherlich durch systematische Suche ein besserer Akzeptor gefunden werden. Vielleicht eignen sich biologisch aktive 20-Oxosteroide besser, wie man sie auch verwendet zur Wasserstoffübertragung von Östradiol auf C-20 (34, 36, 78).

Ob man bessere Ergebnisse erzielt, wenn man eine Isomeren-trennung der Reduktionsprodukte vornimmt, muß noch offen bleiben. Die Rattenleber enthält ja bekanntlich zwei 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Wir wollen mit unseren Aussagen einen prinzipiell möglichen Wasserstoffweg in der Leberzelle aufzeigen, bei dem die verschiedenen Stereoisomeren unberücksichtigt bleiben können. Die Gesamtreduktion der 20-Ketogruppe interessiert in unserem Falle mehr als eine Aussage über die Isomeren-

aufteilung.

Das durch Progesterolwasserstoff reduzierbare 5β -Pregnan-20-on eignet sich als Akzeptor für den Wasserstoff des Östradiols (siehe *Abbildung 5*). Da unser Akzeptor nur an C-20 reduzierbar ist, kann die Wasserstoffübertragung auf C-20 - wiederum unter Vernachlässigung möglicher Isomeren - gut gemessen werden. Es können sich nämlich keine weiteren Metabolite bilden.

Da die Steroid-Dehydrogenasen eine ausgesprochene Positionsspezifität ihrer Oxidoreduktionen zeigen (62, 90, 91), sind in der Leber möglicherweise an einem Wasserstofftransfer von Östradiol auf C-20 des Akzeptors drei Enzyme beteiligt. Die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oxidiert den Wasserstoffdonator, und das Akzeptorsteroid wird durch 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen reduziert. Weil das Coenzym zwischen diesen Enzymen diffundieren muß, kann es sich mit den übrigen zellulären Reduktionsäquivalenten vermischen und in der Atmungskette zu Wasser oxidiert werden. Deshalb wird auch weniger Akzeptor reduziert. Dies kann allerdings auch eine Folge unterschiedlicher Enzymaktivitäten zwischen "Oxidations-" und "Reduktionsenzym" sein. In unserem Falle können die 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen wegen ihrer geringeren Aktivität gar nicht alles NADH, das am anderen Enzym gebildet wird, binden. Darum wird ein großer Teil NADH zu Wasser oxidiert, was auch *Abbildung 7* bestätigt.

Nach all unseren Untersuchungen über den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden mit dem kristallinen Enzym und mit Gewebe können wir sagen, daß dieser ganz allgemein von mehreren Faktoren abhängig ist. Diese sind

1. die Wasserstoffionenkonzentration,
2. das Verhältnis Coenzym / Donator,
3. das Verhältnis Donator / Akzeptor,
4. die Metabolisierungsgeschwindigkeit der Substrate und
5. die Enzymaktivität(en).

3. BIOCHEMISCHE AUSWIRKUNGEN DER OXIDOREDUKTIONEN AN STEROIDEN

a Verhältnisse in der normalen Leber

Der Redoxstatus der Steroidhormone hat großen Einfluß auf ihre biologische Wirkung. Die stark wirksamen Androgene und Östrogene besitzen an C-17 eine alkoholische Gruppe, das Gestagen Progesteron an C-20 eine Ketofunktion. Durch Oxidation des Alkohols bzw. Reduktion der 20-Carbonylgruppe tritt eine Minderung der biologischen Aktivität ein.

Da die Leber das wichtigste Stoffwechselorgan der Steroidhormone ist, untersuchen wir eine wechselseitige Beeinflussung der Steroide in diesem Organ. Wir messen dabei den Einfluß verschiedener 20-Hydroxysteroiden auf das Verhältnis Östradiol / Östron und die

Auswirkungen von 17- bzw. 20-Hydroxysteroiden auf das Progesterol / Progesteron-Verhältnis. Diese gekoppelten Oxidoreduktionen zwischen Steroiden sind die Folge des spezifischen Wasserstofftransfers, da der Weg des Steroidwasserstoffs in der Zelle nicht immer identisch ist mit dem der übrigen zellulären Reduktionsäquivalente (33, 56).

Der geringe Einfluß der 20-Hydroxysteroiden auf den Quotienten Östradiol / Östron (siehe *Tabelle 7*) ist die Folge mehrerer Faktoren, die in den Abschnitten D 1 und D 2 bereits diskutiert sind.

Die Steroid-Dehydrogenasen, die eine Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden katalysieren (siehe C 1 und D 1), besitzen zwar eine Unspezifität gegenüber NAD bzw. NADP und gegenüber Steroids substraten (22), ihre Angriffspunkte am Steroidmolekül sind jedoch streng positionsspezifisch (62, 91). So reagiert die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Rattenleber mit NAD und NADP sowie mit verschiedenen 17-Hydroxysteroiden (22). Die angereicherte 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Humanplacenta setzt verschiedene 17 β -Hydroxysteroiden und 17-Ketosteroiden um, jedoch keine 20-Ketosteroiden (62, 91).

Auf Grund dieser strengen Positionsspezifität sind wahrscheinlich in der Leber bei einem Wasserstofftransfer C-20 $\rightarrow$ C-17 zwei Enzyme beteiligt, die NADH voneinander übernehmen. Da die

20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen eine geringe Aktivität als die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (63, 64, 89, 90) besitzen, wird auch nur wenig Östron durch 20-Steroidalkohole reduziert. So ist der maximale Faktor von 2.15 (siehe *Tabelle 6*) verständlich.

Das unterschiedliche Enzymmuster der männlichen und der weiblichen Rattenleber spiegelt sich auch in einer verschieden starken Beeinflussung des E₂ / E₁-Verhältnisses in ihnen wieder. Die Aktivität der 20 α -Dehydrogenase ist im Weibchen größer als im Männchen. Bei diesen ist die 20 β -Dehydrogenase aktiver (24, 63, 64).

Nach den in den Abschnitten D 1 und D 2 gegebenen Erläuterungen beeinflussen mehrere Faktoren eine Wasserstoffübertragung. Daher darf nicht die Enzymaktivität allein beachtet werden, um eine wechselseitige Beeinflussung des Redoxstatus an Steroiden zu erläutern.

Eine unterschiedliche Wirkung isomerer 20-Hydroxysteroiden ist auch auf das Verhältnis Progesteron / Progesteron festzustellen. Die 20 α -isomere Verbindung ist wirksamer (siehe *Tabelle 7*).

Obwohl in diesem Falle der Wasserstoffübergang nur an C-20 erfolgt, ist der absolute Einfluß gering.

Dies liegt nicht nur an der geringen Aktivität der 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, sondern vermutlich auch an der unterschiedlichen Affinität der Substrate zum Enzym. C_{21} -Steroide mit einer 4-en-Gruppe sind nicht nur gute oder bessere Wasserstoffakzeptoren als 5 α -Pregnane (34, 36, 91), sondern auch wohl effektivere Wasserstoffdonatoren (siehe *Tabelle 6*).

Auf den ersten Blick unverständlich ist der Einfluß von 17-Hydroxysteroiden auf das Progesterol / Progesteron-Verhältnis. Dieser ist nämlich höher als die Auswirkung von 20-Hydroxysteroiden. Umgekehrt haben diese nur eine geringe Wirkung auf den E_2 / E_1 -Quotienten (siehe *Tabelle 6*).

Zur Erläuterung unserer ungewöhnlichen Befunde können die Ergebnisse zur Wasserstoffübertragung von Progesterol auf Östron (57) und von Östradiol auf Progesteron (34) herangezogen werden. Der Anteil des Donatorwasserstoffs an der Akzeptorreduktion ist bei einem Übergang von C-17 auf C-20 immer größer als umgekehrt. Z.B. werden bei 1 μ M Akzeptor und 5 μ M Donator in einem C-17 $\rightarrow$ C-20-Transfer ungefähr 40mal mehr Donatorwasserstoff in den Akzeptor eingebaut als in einem C-20 $\rightarrow$ C-20-Transfer.

Differenzen in der Enzymaktivität können für dieses Ergebnis allein nicht verantwortlich sein. Im Homogenat der Humanplacenta ist die spezifische Aktivität des 17 β -Enzyms 2.5mal größer als

die des 20α -Enzyms (90). Dieser Wert korreliert allerdings mit der unterschiedlichen Progesterol / Progesteron-Beeinflussung durch Östradiol und 20α -Diol. Östradiol reduziert Progesteron um den Faktor 2.8 stärker als 20α -Diol.

b Verhältnisse nach Lebervergiftung durch CCl_4

Tetrachlorkohlenstoff induziert ähnlich wie Äthanol eine Fettleber. In dieser liegt eine veränderte Stoffwechsellage vor. Somit ist in ihr auch der Steroidmetabolismus gestört. Dies macht sich unter anderem in verminderten Hydroxylierungen bemerkbar.

Nach LEVIN ist bei einer CCl_4 -Intoxikation die Östradiolhydroxylierung um etwa 60 % vermindert (92). LEMM beschreibt für Testosteron und Dihydrotestosteron ebenfalls eine Hemmung der Hydroxylierung um etwa 60 % (10).

Derartige Auswirkungen der Tetrachlorkohlenstoffvergiftungen sind unter anderem auf die gestörte Biosynthese der reduzierten und oxidierten Pyridinnukleotide zurückzuführen (73). In der Alkoholfettleber verschiebt sich das NAD / NADH-Verhältnis von 4.5 nach 2.8 (77). Dagegen erhöhen halogenierte Kohlenwasserstoffe das

NAD / NADH-Verhältnis. Trotz einer allgemein gestörten Biosynthese wird nach oraler Gabe von CCl_4 der NAD / NADH-Quotient von 3.9 (Kontrollwert) auf 5.3 angehoben (93). Ähnliches beschreibt IWANOW (94) als Folge von Hexachlorcyclohexangaben. Das Verhältnis NAD / NADH steigt innerhalb von 30 Tagen von 3.7 auf 9.6. Die NAD-Konzentration in der Leber sinkt dabei von 441 $\mu\text{g/g}$ auf 288 $\mu\text{g/g}$ und die NADH-Konzentration von 120 $\mu\text{g/g}$ auf 30 $\mu\text{g/g}$.

Eine verminderte zelluläre Coenzymkonzentration beeinflusst auch zwangsläufig Oxidoreduktionen der Steroide. So messen wir in der Fettleber nach CCl_4 -Vergiftung einen um 50 % verminderten 20-ol / 20-on-Quotienten. Dieser wird wider Erwarten stärker durch Progesteron zur reduzierten Seite verschoben als durch 17-Steroidalkohole (siehe *Tabelle 12*). Ein Effekt, der in diesem Ausmaß in der gesunden Leber nicht zu sehen ist.

Allerdings kann diese Auswirkung nicht nur mit dem erniedrigten NAD-Angebot erklärt werden. Wahrscheinlich sind auch die Steroid-Dehydrogenasen in ihrer Funktion gestört. Da in der Fettleber allgemein die Proteinbiosynthese vermindert ist (72), kann sie sich auch auf die Biosynthese der Enzyme auswirken. Diese scheint jedoch nicht alle Enzyme gleichmäßig zu betreffen. Ähnliche Rückschlüsse ziehen BODE und Mitarbeiter (77), die als Folge des verminderten NAD / NADH-Verhältnisses in der Alko-

holfettleber keine Regelmäßigkeit in der Änderung enzymatischer Reaktionen erkennen können.

Vergleicht man allerdings Steroidmetabolisierungen, bei denen nur reduzierte Pyridinnukleotide als Coenzym fungieren, sieht man doch eine Regelmäßigkeit. Sowohl die Hydroxylierung der Steroide (10, 92) - hier ist NADPH das Coenzym - als auch der 20-ol / 20-on-Quotient - hier wird NAD(P)H benötigt - sind jeweils gegenüber Werten in der gesunden Leber um mehr als 50 % reduziert. Warum bei enzymatischen Prozessen in Gegenwart von NAD(P) dies nicht der Fall ist, entzieht sich unseren Kenntnissen.

Wahrscheinlich sind enzymatische Prozesse von der veränderten Stoffwechsellage in der Fettleber nicht gleichmäßig betroffen. Daher können auch keine allgemein gültigen Rückschlüsse aus unseren Ergebnissen gezogen werden.

c Verhältnisse im Ovar

Im Rattenovar ist ebenso wie in der Leber eine Beeinflussung des Progesterol / Progesteron-Quotienten durch Hydroxysteroiden nachweisbar (siehe *Tabelle 13*). Allerdings ist der Einfluß von Hydroxysteroiden ein anderer als in der Leber. Während in dieser mit 17-Hydroxysteroiden eine intensivere Progesteronreduktion zu erreichen ist als mit 20-Steroidalkohlen, erhöht im Ovar ein

20-Hydroxysteroid das Progesterol / Progesteron-Verhältnis stärker als Östradiol (siehe *Tabelle 13*).

An Hand der Enzymaktivitäten der Steroid-Dehydrogenasen kann man diese Ergebnisse leicht erklären. In Lebermikrosomen ist die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase gegenüber Östradiol als Substrat 4.7mal größer als in der Mikrosomenfraktion des Ovars (22). Die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist dagegen im Ovar aktiver (24). So finden THOMAS und Mitarbeiter (95) im Kaninchenovar nach Progesteroninkubation einen Progesterol / Progesteron-Quotienten von 6.4 und nach Östroninkubation ein E₂ / E₁-Verhältnis von 2.7.

Danach ist der erhöhte Progesterol / Progesteron-Quotient durch einen 20 α -Steroidalkohol im Vergleich zu Östradiol verständlich. Durch die geringere Aktivität werden an der 17-Dehydrogenase weniger Reduktionsäquivalente gebildet als an der 20 α -Dehydrogenase. Ferner müssen mit Östradiol diese noch zur 20 α -Dehydrogenase diffundieren, können sich also mit dem zellulären Pool an Pyridinnukleotiden vermischen. Auszuschließen ist eine Unspezifität der 20 α -Dehydrogenase. Sie besitzt nämlich keine 17 β -Aktivität (96).

Aus diesen Ergebnissen kann man in Verbindung mit der Literatur wiederum ablesen, welche Bedeutung der Enzymaktivität für die Wasserstoffübertragung zukommt: Große Aktivität des "Oxidations-

enzym" entspricht einer hohen Akzeptorreduktion, niedrige Aktivität bedeutet geringe Reduktion.

Da das Ovar ein Zielorgan der Steroidhormone ist, können als Folge des Wasserstofftransfers die biologischen Wirkungen geändert werden. Z.B. wird die biologische Aktivität des Progesterons durch eine Reduktion an C-20 gemindert. Endocrinologische Auswirkungen des Wasserstofftransfers im Ovar sind demnach durchaus zu erwarten.

Allgemeine Aspekte zum Wasserstofftransfer

Abschließend lassen sich einige allgemeingültige Rückschlüsse über den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden ziehen:

1. Er wird an den Steroid-Dehydrogenasen vollzogen.
2. Er ist ein Kompromiß zwischen Oxidation und Reduktion der Substrate an den Dehydrogenasen.
3. Seine Höhe ist abhängig von den Enzymaktivitäten und damit von den Metabolisierungsgeschwindigkeiten der Steroide.
4. Die Höhe des nicht-positionsspezifischen Übergangs hängt entscheidend von der Aktivität des "Oxidations-" und weniger von der Aktivität des "Reduktionsenzym" ab.

E . ZUSAMMENFASSUNG

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die enzymatische Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden. Bislang ist noch nicht endgültig geklärt, welche Enzyme diese Reaktionen katalysieren. Da vermutet wird, daß die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen die verantwortlichen Enzyme sind, benutzen wir für unsere Untersuchungen als Enzymquelle nicht nur tierisches Gewebe, sondern setzen auch kristalline 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ein.

Die Kardinalfrage dieser Arbeit lautet: Kann eine Steroid-Dehydrogenase allein einen Wasserstofftransfer zwischen Steroiden bewirken?

Die Antwort: Mit der Steroid-Dehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans* können wir ohne Zusatz eines weiteren Enzyms eine Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden nachweisen. Die beobachtete Reaktion ist streng positionsspezifisch. Es werden nämlich durch den Steroidwasserstoff nur 20-Ketosteroide reduziert. Diese müssen eine 4-en-Struktur im Ring A oder Ring A/B transverknüpft sein. Das Ausmaß der Wasserstoffübertragung ist abhängig von der NAD-Konzentration. Hier ist offenbar das Verhältnis Donatorsteroid / Coenzym entscheidend.

Auf Grund dieser Befunde ist der Steroid-Dehydrogenase auch eine sogenannte Wasserstofftransferase-Aktivität zuzuschreiben.

Die enzymkinetischen Parameter dieser Reaktion sind andere als bei der üblichen Dehydrogenase-Reaktion. Der enzymatische Wasserstofftransfer ist immer ein Kompromiß zwischen reduktiven wie oxidativen Umsetzungen am Enzym. Diese haben unterschiedliche pH-Optima, so daß je nach Inkubationsbedingungen entweder die eine oder die andere Reaktion bevorzugt abläuft. Daher muß die "Transferase-Aktivität" immer kleiner als die Dehydrogenase-Aktivität sein. Das "Transferase-Protein" ist identisch mit dem Dehydrogenase-Protein.

Mit Rattenleber als Enzymquelle ist ebenfalls eine Wasserstoffübertragung an C-20 und auf C-20 von Pregnanen zu messen. Ein $C-20 \rightarrow C-20$ -Transfer ist ausgeprägter als ein $C-17 \rightarrow C-20$ -Transfer. Bei diesen Oxidoreduktionen besteht ein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Wasserstoffübertragung.

Je größer die Enzymaktivität der Dehydrogenase, desto höher ist die Wasserstoffübertragung am gleichen C-Atom der Steroide. Komplizierter ist die Beziehung bei einem nicht-positionsspezifischen Transfer. Allerdings wirken hier wahrscheinlich zwei Enzyme, die evtl. nahe benachbart sind, zusammen. Besitzt das "Oxidationsenzym" eine größere Aktivität als das "Reduktionsenzym", wird der größere Teil des Steroidwasserstoffs zu Wasser oxidiert und nicht in den Akzeptor eingebaut. Verhalten sich die Enzymaktivitäten genau umgekehrt, wird mehr Akzeptor reduziert.

Als Folge verschiedener Aktivitäten der Steroid-Dehydrogenasen in der Rattenleber werden der Quotient Östradiol / Östron bzw. das Verhältnis Progesteron / Progesteron durch Steroidalkohole unterschiedlich intensiv beeinflusst. So reduzieren 17-Hydroxysteroid Progesteron stärker als 20-Hydroxysteroid Östron. Im Rattenovar ist für Progesteron allerdings Östradiol ein schwächeres Reduktionsmittel als ein 20-Hydroxysteroid. Dies korreliert mit den Enzymaktivitäten.

Durch Tetrachlorkohlenstoffgaben kann man eine Leberschädigung auslösen. In der geschädigten Leber ist der Steroidmetabolismus gestört. Ebenso ist auch der Wasserstofftransfer zwischen Steroiden beeinträchtigt.

F. PRÄPARATIVER TEIL

1. SYNTHESE VON 5 α - UND 5 β -PREGNAN-20-ON

Für unsere Untersuchungen über Oxidoreduktionen an Steroiden benötigen wir Substrate, die von den Steroid-Dehydrogenasen und Reduktasen nur noch in der Position metabolisiert werden können, an der wir eine Umsetzung vermuten. Da wir die Wasserstoffübertragung von der C-20 Position des einen Steroides auf die C-20 Position des zweiten Steroides untersuchen, setzen wir als Akzeptoren 5 α - und 5 β -Pregnan-20-on ein. Die Synthese dieser beiden Steroide erfolgt in Variation der von MARKER und LAWSON angegebenen Vorschrift (97).

600 mg 5 α - bzw. 5 β -Pregnan-3,20-dion werden in 10 ml Äthanol (96 %) gelöst und nach Zugabe von 6 g Zinkspänen 1 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend werden 5 ml einer Mischung gleicher Teile Äthanol (96 %) und konz. Salzsäure hinzugegeben und weitere 2 h bis zum Sieden erhitzt. Sodann werden über einen Zeitraum von 10 h zu der siedenden Lösung 10 ml der Mischung Äthanol / Salzsäure getropft und weitere 2 h erwärmt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung vom Rückstand dekantiert, und dieser mit 5 ml heißem Äthanol gewaschen. Die vereinigten äthanolischen Lösungen werden 36 h bei 0° C der Kristallisation überlassen. Das Kristallisationsprodukt wird 3mal aus Äthanol (70 %) überlassen.

umkristallisiert und im Vakuum 48 h getrocknet.

Ausbeute: 5 α -Pregnan-20-on 348 mg (58% d.Th.)

5 β -Pregnan-20-on 306 mg (51% d.Th.)

Schmp.: 5 α -Pregnan-20-on 128 °C (Lit. 129 °C)

5 β -Pregnan-20-on 113 °C (Lit. 115 °C)

Mol.-Masse (massenspektroskopisch): 5 α -Pregnan-20-on 302

5 β -Pregnan-20-on 302

IR-Spektrum (KBr): keine OH-Bande zwischen 3 000 und 3 300 cm⁻¹

Elementaranalyse: C₂₁H₃₄O

5 α -Pregnan-20-on Ber. C 83.37 H 11.33

Gef. C 83.40 H 11.27

5 β -Pregnan-20-on Ber. C 83.37 H 11.33

Gef. C 83.39 H 11.25

DC-Chromatogramm: Fließmittel Chloroform / Aceton 9 + 1

	R_f -Wert
5 α -Pregnan-20-on	0.60
5 α -Pregnan-3,20-dion	0.48
5 β -Pregnan-20-on	0.58
5 β -Pregnan-3,20-dion	0.45

2. SYNTHESE VON 5 α - UND 5 β -PREGNAN-20 β -OL

Die Synthese der 20 β -Steroidalkohole kann auf zwei verschiedenen Arten erfolgen. Zum einen setzt man das Oxosteroid in Gegenwart von 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen mit NADH um, zum anderen reduziert man die Ketogruppe mit Natriumborhydrid. Für den präparativen Maßstab eignet sich natürlich die zweite Methode besser. Außerdem werden hiermit auch 20-Ketosteroide selektiv zur 20 β -Hydroxyverbindung reduziert (102).

100 mg 5 α - bzw. 5 β -Pregnan-20-on werden in 50 ml Methanol gelöst und bei Zimmertemperatur mit 500 mg NaBH₄ suspendiert in 25 ml Methanol, in kleinen Anteilen über 4 h versetzt. Nach insgesamt 6 h wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Eisessig gestoppt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert, und der Rückstand in 10 ml Chloroform aufgenommen. Der Steroidalkohol wird dünnschichtchromatographisch vom Oxosteroid getrennt.

Zur Überprüfung der Spezifität dieser Reaktion werden die 20 β -Hydroxysteroiden zusätzlich aus den Ketosteroiden mit Hilfe der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase hergestellt. In Anlehnung an die Vorschrift von CREMONESI und CASELATTO (98) werden 10 μ mol NADH und 10 μ g Enzym in 2 ml 0.1 M Phosphatpuffer, pH 6.5, mit 5 μ mol Steroid in 2 ml Butylacetat 60 min inkubiert. Ein Aliquot dieser Lösungen wird mit einem Aliquot der nach der anderen

Methode hergestellten Hydroxysteroiden im Fließmittel Chloroform / Aceton 9 + 1 chromatographiert. Die Steroide werden nach Ansprühen mit Primulin-Reagenz bei 350 nm sichtbar gemacht (99). Die R_f -Werte der nach beiden Methoden hergestellten Substanzen sind identisch, so daß von der Einheitlichkeit der Reaktionsprodukte ausgegangen werden kann.

	R_f -Wert	
	Methode A	Methode B
5 α -Pregnan-20 β -ol	0.50	0.50
5 α -Pregnan-20-on	0.60	0.59
5 β -Pregnan-20 β -ol	0.48	0.48
5 β -Pregnan-20-on	0.58	0.58

Nach der dünnschichtchromatographischen Trennung der nach der Methode A gewonnenen Hydroxysteroiden werden diese aus 70proz. Äthanol umkristallisiert und bei 0 °C der Kristallisation überlassen. Leider ist es nicht möglich, von 5 β -Pregnan-20 β -ol ein kristallines Produkt zu erhalten. Wir bekommen immer eine sirupähnliche Lösung. 5 α -Pregnan-20 β -ol kristallisiert gut und gibt Nadeln, die bei 139 °C schmelzen (Lit. 140 °C). Die Ausbeute an 5 α -Pregnan-20 β -ol beträgt 35 mg (35% d.Th.) und an 5 β -Pregnan-20 β -ol 27 mg (27% d.Th.).

Um die Spezifität der 20-Ketoreduktion mit NaBH₄ zu überprüfen,

inkubieren wir 10 μmol NAD und 10 μg 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 8.5, mit 1 μmol Hydroxysteroid in 2 ml Butylacetat 120 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$. Auf dem Dünnschichtchromatogramm ist nach dem Ansprühen mit Primulin-Reagenz nur ein Fleck von 20-Oxosteroid und kein OH-Produkt (20 α) zu erkennen. Dieses Ergebnis beweist, daß 20-Ketosteroide mit Natriumborhydrid selektiv zu 20 β -Steroidalkoholen reduziert werden.

3. SYNTHESE VON 5 α -[4- ^{14}C]PREGNAN-3,20-DION

Um bei der Oxidoreduktion an C-20 von Progesteron weitere Umsetzungen - bedingt durch $\Delta 4$ -Steroidreduktasen - auszuschalten, suchen wir nach Wegen, ^{14}C -markierte Pregnane zu synthetisieren. Als einfachste Methode erweist sich eine enzymatische Reduktion der 4-en-Gruppe des Progesterons mit Hilfe der 5 α -Steroidreduktase. Dieses Enzym befindet sich u.a. in der Mikrosomenfraktion des weiblichen Rattenleber (100). Da diese Enzymquelle keine 5 β -Steroidreduktasen-Aktivität besitzt, vereinfacht sich die anschließende Aufarbeitung. Es entfällt nämlich die Isomerenauftrennung. Deshalb werden weibliche Rattenlebermikrosomen präpariert und anschließend unter den bei SCHRIEFERS (100) beschriebenen Bedingungen 10 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ mit [^{14}C]Progesteron inkubiert.

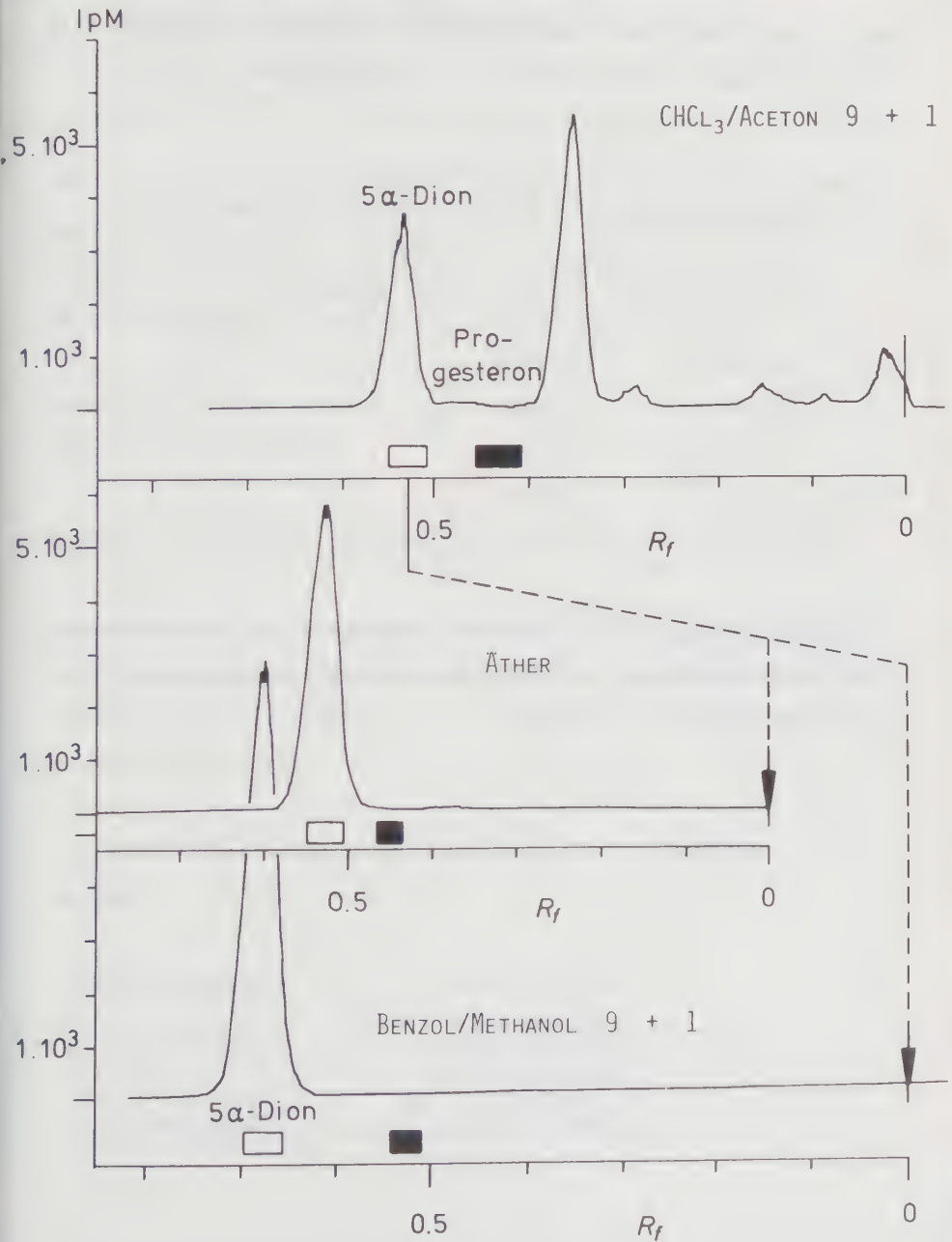
Inkubationsansatz:

MgCl ₂	2.4	μmol	
Glucose-6-phosphat	17	μmol	
NADP	0.5	μmol	
[¹⁴ C]Progesteron	0.13	μmol	≅ 7.9 μCi
Glucose-6-phosphat-DH	10	μg	
Mikrosomensuspension	0.5	ml	≅ 250 mg Leber
0.05 M TRIS-HCl-Puffer, pH 7.4	0.5	ml	
Endvolumen	1.0	ml	

Nach der Inkubation werden die Steroide 4mal mit je 2 ml Methylenchlorid extrahiert und dünnschichtchromatographisch in dem Fließmittel Chloroform / Aceton 9 + 1 (vgl. *Abbildung 11* oben) getrennt. Es sind sechs Peaks zu erkennen. Die dem 5α-Pregnan-3,20-dion entsprechende Zone wird von der DC-Platte abgeschabt, und die radiochemische Reinheit durch Rechromatographie im System Benzol / Methanol 9 + 1 und in Äther bewiesen. Die R_f -Werte sind jeweils mit dem des 5α-Pregnan-3,20-dion identisch.

Die radiochemische Reinheit wird durch Umkristallisation des Syntheseproduktes mit inaktivem 5α-Pregnan-3,20-dion bewiesen. Zu einem Aliquot der radioaktiven Probe werden 100 mg "kaltes" 5α-Pregnan-3,20-dion gegeben und aus verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert. Dabei wird die spezifische Aktivität

ABB. 11: DC-REINIGUNG VON 5α -[4- ^{14}C]PREGNAN-3,20-DION



(ZpM/mg) nach jeder Umkristallisation neu bestimmt. Diese ist in allen Lösungsmitteln innerhalb der Fehlergrenzen konstant. Das Präparat ist demnach radiochemisch rein.

TAB. 14: UMKRISTALLISATION VON $[^{14}\text{C}]$ PREGNAN-3,20-DION

Lösungsmittel		spez. Akt. (ZpM/mg)
1.	Äthanol	1108
2.	Äthanol	1142
3.	Essigester	1083
4.	Dioxan	1114

Die Ausbeute an 5α -[4- ^{14}C]Pregnan-3,20-dion beträgt nach allen Reinheitsprüfungen und Umkristallisationen 23.8 % der eingesetzten Aktivität.

G. MATERIAL UND METHODIK

Substanzen

Alle Substanzen und Reagenzien weisen p.a. Qualität auf. Soweit erforderlich werden die Substanzen zusätzlich chromatographisch gereinigt. Die verwendeten Lösungsmittel werden vor Gebrauch destilliert und unter Lichtschutz aufbewahrt.

Inaktive Steroide stammen von den Firmen Schering AG, Berlin, und E.Merck, Darmstadt.

Coenzyme sind Handelspräparate der Fa. Boehringer, Mannheim.

Die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird von der Fa. Boehringer, Mannheim, als Kristallsuspension in 2.2 M Ammoniumsulfatlösung, pH etwa 6, bezogen. Die spezifische Aktivität beträgt etwa 10 U/mg Protein.

An radioaktiven Substanzen werden von der Fa. Amersham / Buchler bezogen.

[4- ¹⁴ C]Progesteron	60.7 mCi/mmol
[4- ¹⁴ C]Cortison	58.0 mCi/mmol
[4- ¹⁴ C]Östron	58.0 mCi/mmol
[17 α -T]Östradiol	11.0 Ci/mmol

TAB. 15: ZUSAMMENSTELLUNG DER VERWENDETEN STEROIDE

Name		Zeichen
C ₂₁ -Steroide	4-Pregnen-17 α ,21-diol-3,11,20-trion	Cortison
	4-Pregnen-3,20-dion	Progesteron
	4-Pregnen-20 α (20 β)-ol-3-on	Progesterol
	4-Pregnen-3-on	4-Pregnen-3-on
	5 α -Pregnan-3,20-dion	5 α -P-dion
	5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	5 α -Diol (20 α)
	5 α -Pregnan-3 α ,20 β -diol	5 α -Diol (20 β)
	5 α -Pregnan-20-on	5 α -20-on
	5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on	3 α ,5 α -on
	5 β -Pregnan-20-on	5 β -20-on
	5 β -Pregnan-3 α -ol-20-on	3 α ,5 β -on
C ₁₉ -Steroide	4-Androsten-3-on	4-Androsten-3-on
	5 α -Androstan-3,17-dion	5 α -A-dion
	5 α -Androstan-17 β -ol-3-on	5 α -DHT
C ₁₈ -Steroide	1,3,5(10)-Östratrien-3,17 β -diol	Östradiol
	1,3,5(10)-Östratrien-3-ol-17-on	Östron

20 β -Hydroxy-4-[20 α -T]pregnen-3-on wird durch Verseifen aus dem Ketal 3,3-Äthylen-20 β -hydroxy-5-[20 α -T]pregnen (57) synthetisiert, Spez. Akt. 11 Ci/mmol.

5 α -[4-¹⁴C]Pregnan-3,20-dion stammt aus eigener Synthese. Spez. Akt. 60.7 mCi/mmol.

Vor der Verwendung der radioaktiven Substanzen erfolgt eine chromatographische Reinheitskontrolle.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen männliche und weibliche Wistar-Ratten der Labortierzucht Fa. Hagemann, Börsingfeld/Hannover. Die erwachsenen Tiere haben ein Gewicht zwischen 180 und 200 g. Sie sind etwa 70 Tage alt.

Die Tiere erhalten ein Standardfutter (Altromin R) und Wasser nach Bedarf.

Gewebeinkubationen

Die Tiere werden nach Narkotisieren mit Äther durch Herzschnitt getötet. Die entnommenen Organe werden sofort in eiskalte Pufferlösung überführt.

Die Zeit zwischen dem Exitus der Tiere und dem Inkubationsbeginn beträgt nicht mehr als 15 min.

Organschnitte

Die Organe werden von Fett und anhaftendem Gewebe befreit und auf einen mit Filterpapier bedeckten Eisblock gebracht. Flach ziehend werden mit einer Rasierklinge etwa 0.5 mm dünne Schnitte angefertigt und sogleich in eiskalten Puffer gelegt.

Ovar, Vagina und Uterus werden der Länge nach gespalten und mit der Schere zerkleinert.

Gewebehomogenat

Eine entsprechende Menge an kleingeschnittenem Gewebe wird in TRIS-HCl-Puffer, pH 7.4, unter Eiskühlung mit einer Potter Elvehjem Homogenisator bei 400 U/min homogenisiert.

Zellfraktionen

Die Herstellung der morphologischen Zellfraktionen erfolgt in einer Beckman Spinco Ultrazentrifuge mit Festwinkel-Rotor Typ Titan 50.

Das Gewebehomogenat wird 15 min bei $10\,000 \times g$, entsprechend 13 000 U/min, zentrifugiert. Das aus Zellkernen und Mitochondrien bestehende Zentrifugat wird verworfen. Der Überstand wird erneut 60 min bei $105\,000 \times g$, entsprechend 41 000 U/min, zentrifugiert. Das vom Überstand abgetrennte Sediment stellt die Mikrosomenfraktion dar. Der Überstand ist die Cytoplasmafraktion (103). Zur Reinigung werden die Mikrosomen 3mal in 5 ml Puffer suspendiert und 45 min bei 41 000 U/min zentrifugiert. Zur Inkubation wird die Mikrosomenfraktion in einer entsprechenden Menge Puffer suspendiert und homogenisiert.

Inkubationsansätze

Ein Inkubationsansatz besteht entweder aus der kristallinen 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oder aus Gewebeschnitten, -fraktionen oder -homogenat als Enzymquelle, den Steroiden und evtl. Zusätzen wie z.B. Coenzyme. Im allgemeinen enthält ein Ansatz 2 ml Puffer und 100 mg Gewebe. Die Steroide werden in 0.1 ml Äthanol (90 %) / Wasser 1 + 2 gelöst oder ebenso wie die anderen Substrate der bereiteten Pufferlösung zugemischt.

Die Inkubation wird gestartet durch Einbringen des Ansatzes in den auf 37 °C temperierten Warburgschüttelthermostaten.

Inkubationsstop erfolgt durch Einbringen der Gefäße in Eis und Zugabe von Chloroform oder Methylenchlorid.

Bei allen Versuchen werden mindestens 2 Kontrollansätze zusätzlich inkubiert und aufgearbeitet.

Aufarbeitung der Inkubationsansätze

Extraktion

Zur Extraktion der Steroide werden die Inkubationsansätze 4mal mit 3 ml Chloroform oder Methylenchlorid ausgeschüttelt. Zur Verminderung von Adsorptionseffekten und zur Vermeidung von Zersetzungen werden sowohl im Puffer als auch dem organischen Extrakt ein Überschuß an "kaltem" Steroid zugefügt. Die organischen Phasen werden vereinigt und im Wasserbad bei 40 °C im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt.

Dünnschichtchromatographie

Der zur Trockene eingengte organische Extrakt wird mehrmals in Aceton (insgesamt 0.5 ml) aufgenommen und quantitativ mit einer Kapillare in Bahnen von 2.5 cm Breite auf eine DC-Platte der Fa. Merck (Kieselgel F₂₅₄, 0.25 mm Schichtdicke) aufgetragen. Es wird aufsteigend in folgenden Fließmitteln chromatographiert (Angaben in Volumenteilen):

System A: Chloroform / Aceton	9 + 1
System B: Cyclohexan / Essigester	6 + 4
System C: Essigester / Xylol / Methanol	90 + 10 + 1
System D: Äther	100
System E: Benzol / Methanol	9 + 1

Inaktive Steroide dienen als Referenzsubstanzen und werden entweder direkt im UV-Licht bei 254 nm oder nach Ansprühen mit Primulin-Lösung (99) bei 350 nm sichtbar gemacht.

Die Lage der radioaktiven Steroide wird durch direkte Aktivitätsmessung mit dem Dünnschichtscanner der Fa. Berthold, Wildbad / Schwarzwald, kombiniert mit Autochronschreiber, ermittelt (101). Die quantitative Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Integrationschreibers oder durch Planimetrie. Die Zählausbeuten des Scanners liegen bei einem Abstand von 0.5 mm (Oberfläche DC-Platte/Zählrohr) für Tritium bei 0.8 % und für ^{14}C bei 17 %.

Die Wiederfindung der Steroide aus den Ansätzen beträgt 80 bis 85 % oder mehr.

Flüssig-Szintillationsmessung

Radioaktive Lösungen, Proben und von der DC-Platte abgeschabte Kieselgelbanden werden im Beckman LS 150 Flüssig-Szintillations-

Zähler gemessen. Als Szintillationscocktail wird Unisolve 1 der Fa. Zinsser verwendet. Die Zählflasche wird mit einem externen Standard, bei Kieselgelproben mit einem internen Standard ermittelt.

HTO-Bestimmung

Die Inkubationsansätze werden nach Abtrennung der Steroide der Gefrierdestillation unterworfen. In einem von zwei - durch Hahnenteil und Schliff miteinander verbundenen - Reagenzglasern wird die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Evakuierung des Systems wird das leere Reagenzglas in flüssigen Stickstoff getaucht und dient als Vorlage für das kondensierende Wasser. Die Menge des kondensierten HTO wird im Flüssigszintillationszähler gemessen.

Lebervergiftung

Den Ratten wird an zwei aufeinanderfolgenden Tagen alle 12 h je 0.5 ml Tetrachlorkohlenstoff pro kg subkutan injiziert und am dritten Tag der Versuch durchgeführt. Die verabfolgte Menge CCl_4 entspricht etwa der von Sasanne verabreichten Dosis (75), die unter anderem zu einer Vergrößerung und Verhärtung der Leber führt.

H. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. McGuire, J.S. und Tomkins, G.M. Arch.Biochem.Biophys.
82 (1959) 476
2. McGuire, J.S. und Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
234 (1959) 791
3. McGuire, J.S. und Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
235 (1960) 1634
4. Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
225 (1957) 13
5. McGuire, J.S., Hollis, V.M. und Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
235 (1960) 11
6. Frederiksen, D.W. und Wilson, J.D. J.Biol.Chem.
246 (1971) 2584
7. Verhoeven, G. und DeMoor, P. Endocrinology
89 (1971) 842
8. Arimisa, N. und Kochakian, C.D. Endocrinology
92 (1973) 72
9. Nozu, K. und Tamaoki, B. Acta Endocr.
76 (1974) 608
10. Lemm, U. Dissertation FU Berlin
Fachbereich Pharmazie
1976
11. Golf, S.W., Graef, V. und Staudinger, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
355 (1974) 1499

12. Levy, H.R. und Talalay, P. J.Biol.Chem.
234 (1959) 2009
13. Levy, H.R. und Talalay, P. J.Biol.Chem.
234 (1959) 2014
14. Schubert, K., Böhme, K.-H.
und Kühn, Ch. Monatsberichte DAW
34 (1959) 517
15. Conney, A.H. und Klutsch, I.A. J.Biol.Chem.
238 (1963) 1611
16. Arimisa, N. und Kochakian, C.D. Steroids
19 (1972) 325
17. Hübener, H.J. und Staib, H. Biochemie der NNR-Hormone
Thieme-Verlag, Stuttgart
1965
18. Kochakian, C.D. und Endahl, B.R. Proc.Soc.expl.Biol.
104 (1960) 720
19. Kinson, G.A. und Kochakian, C.D. Am.J.of Physiol.
206 (1964) 443
20. Ghraf, R., Raible, M. und
Schriefers, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
354 (1973) 299
21. Hoff, H.G., Ghraf, R., Raible, M.
und Schriefers, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
354 (1973) 306

22. Ghraf, R., Vetter, U. und Schriefers, H. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. **355** (1974) 543
23. Ghraf, R., Vetter, U., Zandveld, J.M. und Schriefers, H. Acta Endocr. **79** (1975) 192
24. Breuer, H. in Handbuch der Physiol.- und Patholog.-Chem.Analyse Band 6, Teil A S. 423-549, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1964
25. Breuer, H. und Dahm, K. Biochem.Biophys.Acta **85** (1964) 29
26. Dahm, K. und Breuer, H. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. **338** (1964) 63
27. Breuer, H., Ozon, R. und Mittermeyer, C. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. **333** (1963) 272
28. Villee, C.H. und Spencer, J.M. J.Biol.Chem. **235** (1960) 3615
29. Lehmann, W.D. und Breuer, H. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. **348** (1967) 1633

30. Jarabak, J., Adams, J., Williams- J.Biol.Chem.
Asham, H.G. und Talalay, P. 237 (1962) 345
31. Karavolas, H.J., Orr, J.C. und J.Biol.Chem.
Engel, L.L. 244 (1969) 4413
32. Talalay, P. und Williams-Asham, H.G. Rec.Progr.in Hormon
Res.
16 (1960) 1
33. Wenzel, M.; Bollert, B. und Hoppe-Seyler's
Ahlers, B. Z.Physiol.Chem.
355 (1974) 969
34. Wenzel, M., Langold, M. und J.Biol.Chem.
Hallac, P. 244 (1969) 4523
35. Wenzel, M. Biochem.Biophys.Acta
152 (1968) 431
36. Wenzel, M. und Hieronimus, B. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
353 (1972) 1477
37. Wenzel, M. und Mützel, W. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
351 (1970) 1221
38. Wenzel, M., Pollow, K. und Z.Naturforsch.
Ziebarth, T. 22 b (1967) 894

- | | |
|---|---|
| 39. Wenzel, M. und Pollow, K. | Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
348 (1967) 1667 |
| 40. Wenzel, M. und Wolf, S. | Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
350 (1969) 1203 |
| 41. Lindner, F., Junk, R., Nesemann,
G. und Schmidt-Thome, J. | Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
313 (1958) 117 |
| 42. Hübener, H.J. und Lehmann, C.D. | Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
313 (1958) 124 |
| 43. Hübener, H.J., Sahrholz, F.G.,
Schmidt-Thome, J., Nesemann, G.
und Junk, R. | Biochem.Biophys.Acta
35 (1959) 270 |
| 44. Hübener, H.J. und Sahrholz, F.G. | Biochem.Z.
333 (1960) 95 |
| 45. Hübener, H.J. und Schmidt-Thome, J. | DBP 1075521 (1960) |
| 46. Schmidt-Thome, J., Nesemann, G.,
Hübener, H.J. und Alester, I. | Biochem.Z.
336 (1962) 322 |
| 47. White, J.H. und Jefferey, J. | Eur.J.Biochem.
25 (1972) 409 |
| 48. Betz, G. und Warren, J.C. | Arch.Biochem.Biophys.
128 (1968) 745 |

49. Pocklington, T. und Jefferey, J. Eur.J.Biochem.
7 (1968) 63
50. Gibb, W. und Jefferey, J. Eur.J.Biochem.
23 (1971) 336
51. Blomquist, Ch.-H. Arch.Biochem.Biophys.
159 (1973) 590
52. Bjorkhem, I. und Danielsson, H. Eur.J.Biochem.
12 (1970) 80
53. Bjorkhem, I. und Holmberg, I. Eur.J.Biochem.
33 (1973) 364
54. Hatana-Sato, F., Takagi, Y. und
Shikita, M. J.Biochem.
74 (1973) 1065
55. Freudenthal, R.J., Kepler, J.A.
und Cook, C.E. Anal.Biochem.
51 (1973) 632
56. Wenzel, M., Pitzel, L. und
Rießelmann, B. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
356 (1975) 459
57. Pitzel, L. Dissertation FU Berlin
Fachbereich Chemie 1971
58. Mützel, W. Dissertation FU Berlin
Fachbereich Pharmazie
1970

68. Hübener, H.J.
in H.U.Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1962, S. 485
69. Wiest, W.G. und Wilcox, R.B.
J.Biol.Chem. **236** (1961) 2025
70. Henschler, D.
in Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, B.I. Mannheim/Wien/Zürich 1975, S. 525
71. Plaá, G.L. und Larson, R.E.
Enviromental Health **9** (1964) 536
72. Smuckler, E.A.
Biochem.Biophys.Res. Commun. **5** (1961) 536
73. Gibb, J.W. und Brody, T.W.
Biochem.Pharmacol. **16** (1967) 2047
74. Brenner, G.
Arzneim.-Forsch. **18** (1968) 1153
75. Sasanne, H.A., Castro, J.A. und Gillette, J.R.
Biochem.Pharmacol. **17** (1968) 1759

76. Greene, E.E., Stripp, B. und
Gillette, J.R. Biochem.Pharmacol.
20 (1971) 2531
77. Bode, Ch., Kono, H., Goebel, H.,
Bode, Ch. und Martini, G.A. Klin.Wschr.
48 (1970) 1180
78. Pollow, K., Sokolowski, G. und
Pollow, B. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
353 (1972) 43
79. Wiest, W.G. Endocrinology
73 (1963) 310
80. Wiest, W.G. J.Biol.Chem.
234 (1959) 3115
81. Wiest, W.G. J.Biol.Chem.
238 (1963) 94
82. Wiest, W.G. in Methods in Enzymo-
logy
Vol. XV (1969) 638
83. Brühmüller, M. Biochemische Diplomar-
beit FU Berlin 1966
84. Norymberski, J.K., Stoddart, N.
und Wolstenholme, J.B. Biochem.J.
145 (1975) 47
85. Henning, H.D. und Zander, J. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
330 (1962) 31

86. Betz, G. und Taylor, P. Arch.Biochem.Biophys.
137 (1970) 107
87. Pollow, K. und Pollow, B. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
353 (1972) 53
88. Pollow, K., Runge, W., Pollow, B., Hoppe-Seyler's
Grunz, H., Willems, W.R. und Z.Physiol.Chem.
Schmalbeck, J. **354** (1973) 705
89. Einarsson, K., Gustafsson, J.-A. Biochem.J.
und Hellström, K. **136** (1973) 623
90. Pollow, K., Sokolowski, G., Hoppe-Seyler's
Grunz, H. und Pollow, B. Z.Physiol.Chem.
355 (1974) 501
91. Pollow, K., Sokolowski, G., Hoppe-Seyler's
Schmalbeck, J. und Pollow, B. Z.Physiol.Chem.
355 (1974) 515
92. Levin, W., Welch, R. und J.Pharmacol.Exp.Ther.
Conney, A.H. **146** (1964) 280
93. Slater, T.F., Strauli, U.D. und Biochem.J.
Saweyer, B.C. **93** (1964) 280
94. Iwanow, E. Acta Hepato-Gastro-
enterol.
20 (1973) 39

95. Dennis, P.M., Hughes, H. und Thomas, G.H. J.Endocrin.
40 (1968) 257
96. Wilcox, R.G. und Wiest, W.G. Steroids
7 (1966) 395
97. Marker, R.E. und Lawson, E.J. J.Am.Chem.Soc.
61 (1939) 852
98. Cremonesi, P. und Casellato, M.M. J.Labbeled Compd.
9 (1973) 521
99. Wright, R.S. J.Chromatogr.
59 (1971) 220
100. Schriefers, H., Ghraf, R., Hoff, H.G. und Ockenfels, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
352 (1971) 1363
101. Simon, H., Rauschenbach, P., Tykva, R., Wenzel, M. und Schmidt, H.-L. in Messung von radio-
aktiven und stabilen
Isotopen (Simon, H.
Hrsg.), Springer-Ver-
lag, Berlin-Heidelberg-
New York 1974
102. Schenker, E. Angew.Chem.
73 (1961) 81

103. Lang, K. und Siebert, G.

in Handbuch der Physiol.-
und Patholog.-Chem.Analyse
Band 2, S. 537 - 594,
Springer Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York 1955

104. Pollow, K., Runge, W. und
Pollow, B.

Z.Naturforsch.
30 c (1975) 17

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 2. Januar 1948

Geburtsort: Dinklage, Kreis Vechta

Eltern: Lehrer Joseph Rießelmann und Ehefrau
Hedwig, geb. Ruhe

Schulbildung: 1954 bis 1958 Volksschule in Bahlen, Kreis
Vechta
1958 - 1966 Gymnasium Antonianum Vechta

Reifeprüfung: 23. September 1966

Pharmazeutisches
Praktikum: 1. Oktober 1966 bis 31. September 1968
Einhorn-Apotheke Osnabrück

Pharmazeutische
Vorprüfung: 6. September 1968 in Osnabrück

Studium: Sommersemester 1969 bis Wintersemester 1969/70
TU Berlin
Sommersemester 1970 bis Wintersemester 1971/72
FU Berlin

Staatsexamen: 26. April 1972

Approbation: 26. Mai 1972

Assistententätig-
keit: Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit im
Oktober 1972 unter der Anleitung von Herrn
Prof. Dr. M. Wenzel. Seit dem 1. April 1973
Wiss.Ass. am Pharmazeutischen Institut der
FU Berlin.

